

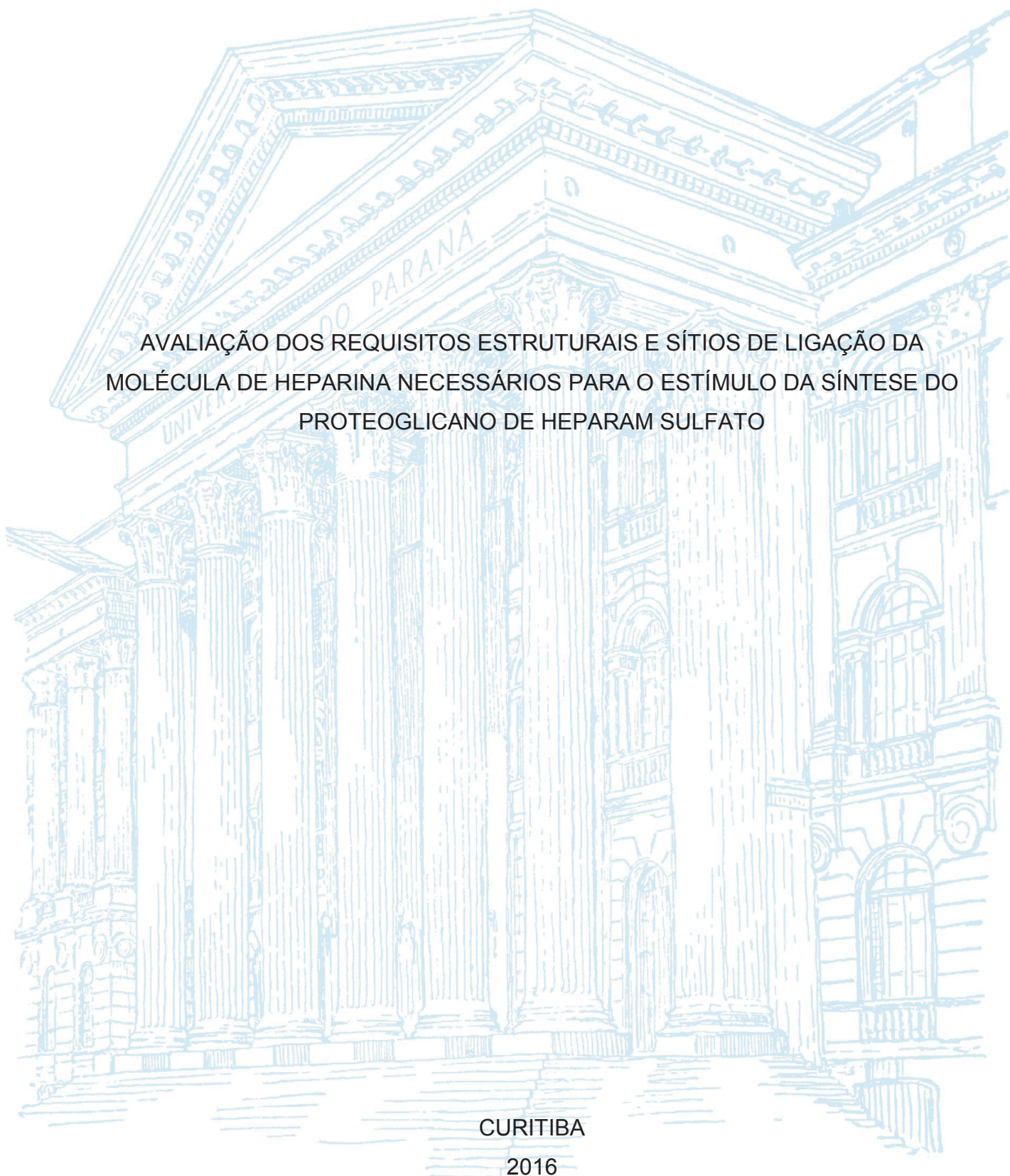
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUSTAVO RODRIGUES ROSSI

AVALIAÇÃO DOS REQUISITOS ESTRUTURAIS E SÍTIOS DE LIGAÇÃO DA
MOLÉCULA DE HEPARINA NECESSÁRIOS PARA O ESTÍMULO DA SÍNTESE DO
PROTEOGLICANO DE HEPARAM SULFATO

CURITIBA

2016



GUSTAVO RODRIGUES ROSSI

AVALIAÇÃO DOS REQUISITOS ESTRUTURAIS E SÍTIOS DE LIGAÇÃO DA
MOLÉCULA DE HEPARINA NECESSÁRIOS PARA O ESTÍMULO DA SÍNTESE DO
PROTEOGLICANO DE HEPARAM SULFATO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Andrade de Lima

CURITIBA
2016

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Rossi, Gustavo Rodrigues

Avaliação dos requisitos estruturais e sítios de ligação da molécula de heparina necessários para o estímulo da síntese do proteoglicano de heparan sulfato. / Gustavo Rodrigues Rossi. – Curitiba, 2016.
59 p.: il.

Orientador: Edvaldo da Silva Trindade
Coorientador: Marcelo Andrade de Lima

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Heparina 2. Proteoglicanas de heparan sulfato 3. Matriz extracelular
4. Fibronectinas I. Título II. Trindade, Edvaldo da Silva III. Lima, Marcelo
Andrade de IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 547.782

Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná



PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Profa. Dra. Helena Bonciani Nader
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Suplente:

Profa. Dra. Andrea Senff Ribeiro
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir o mestrando **Gustavo Rodrigues Rossi**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Avaliação dos requisitos estruturais e sítios de ligação da molécula de heparina necessários para o estímulo da síntese do proteoglicano de heparan sulfato", são de parecer favorável à aprovação do acadêmico, habilitando-o ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 29 de Março de 2016

AGRADECIMENTOS

Como sou uma pessoa que não consegue demonstrar os meus sentimentos através da escrita, considerem esses agradecimentos potencializados! Todas as pessoas citadas nessa seção, de alguma maneira participaram de maneira significativa da minha vida nesses últimos dois anos, cientificamente e/ou de maneira afetiva!

Aos meus pais, Elisabete e Fernando, por sempre incentivarem os meus estudos, estarem presentes me dando apoio (mesmo nos momentos em difíceis) e serem essenciais no meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus irmãos Vinícius e Leandro, por todo o companheirismo.

À minha namorada Jenifer que sempre está do meu lado em todos os momentos, sendo minha melhor amiga! Sempre tornando os meus dias mais felizes! Sempre ouvindo minhas ideias mirabolantes, discutindo ciência, compreendendo as minhas viagens para São Paulo e assistindo aos jogos do Corinthians comigo no domingo à tarde!

Ao meu orientador, Prof. Edvaldo, que é um exemplo de profissional! Contribuiu muito no meu crescimento acadêmico (e ainda tem muito mais para contribuir), sempre me orientando, discutindo os experimentos e resultados. E também por ser um grande amigo!

À Prof^a. Carolina Camargo de Oliveira, que também contribuí muito para o meu crescimento científico.

À Prof^a. Helena Nader, por sempre deixar as portas do seu laboratório abertas!

Ao Prof. Marcelo Andrade de Lima por ajudar nas modificações químicas e a discutir os meus resultados.

Ao Prof. Silvio Marques Zanata, por me ajudar no desenho, aquisição e realização dos experimentos do siRNA, e por nos ceder o anticorpo anti fibronectina, produzido em seu laboratório.

Ao Prof. Silvio Sanches Veiga, por avaliar todos os meus relatórios de mestrado e participar nas discussões científicas e também futebolísticas.

A Lisandra e ao Israel, do Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência (CTAF), por sempre arrumarem um horário para utilização do confocal e por todo o companheirismo e amizade!

Aos meus Avós Paulo e Marllene, por sempre me receberem em sua casa, nos períodos de experimentos na UNIFESP.

A todo o pessoal do Laboratório de Investigação de Polissacarídeos Sulfatados e do Laboratório de Células Neoplásicas e Inflamatórias: Ana, Daniel, Fernanda, Malu, Stelley, Vivi, Thais.

Ao Renan, Gustavo, Cica, Isabel, Aline, Elza da UNIFESP, por me receberem bem no laboratório e me auxiliarem nos experimentos.

Aos meus amigos dos outros laboratórios: Adriano, Alex, Bruno, Gabriel, João e Thiago por toda a amizade!

A CAPES pela bolsa de Mestrado.

Ao CNPq, CAPES e Fundação Araucária que financiaram esse projeto!

RESUMO

Heparina é um polissacarídeo linear e altamente aniônico, pertencente à família dos glicosaminoglicanos (GAGs). Sua estrutura química é formada por unidades repetitivas de dissacarídeos, que são compostas alternadamente por uma D-glucosamina (que pode ser *N*-sulfatada ou *N*-acetilada e 6-O-sulfatada), e um ácido urônico (L-idurônico podendo apresentar um grupamento sulfato 2-O ligado ou ácido D-glucurônico – não sulfatado). Assim, sua alta densidade de cargas negativas é decorrente dos grupamentos sulfatos e dos grupamentos carboxílicos, presentes nos ácidos urônicos. O heparam sulfato é outro GAG cuja composição química é muito similar com a molécula de heparina, porém com menor grau de sulfatação e maior quantidade de ácido D-glucurônico. Esses compostos são encontrados ligados covalentemente a proteínas, formando os proteoglicanos. O proteoglicano de heparam sulfato (PGHS), presente na superfície das células endoteliais, é responsável por manter a compatibilidade dessas com o sangue, isto é, age impedindo a coagulação sanguínea naquele local. Dessa forma, esse PGHS já possui uma característica antitrombótica. Porém, quando essas células (em cultura) são expostas à heparina exógena ocorre um aumento da síntese desse PGHS, tornando-o também mais sulfatado, e conseqüentemente, aumentando sua atividade antitrombótica. Dados prévios mostram que esse efeito ocorre pela interação da heparina com moléculas da matriz extracelular (MEC), o que leva a um estímulo de vias de sinalização celular que envolvem MEK/ERK. No entanto, ainda não são conhecidos os requisitos estruturais da molécula de heparina e seu(s) possível(is) sítio(s) de ligação(ões) na MEC que é(são) responsável(is) por desencadear o estímulo da síntese do PGHS. Para responder quais são os requisitos estruturais, a heparina foi submetida a modificações químicas específicas e células endoteliais foram estimuladas com essas moléculas modificadas. As heparinas *N*, ou 6-O ou 2-O dessulfatadas ou carboxirreduzida foram capazes de estimular a síntese do PGHS, quando comparadas com o controle, porém o estímulo foi menor do que a heparina não modificada. Já a heparina totalmente dessulfatada não estimulou a síntese. Portanto, esse estímulo não é dependente exclusivamente de um grupamento sulfato em específico ou das carboxilas e sim, da quantidade de sulfato presente na heparina. Para avaliar qual(is) sítio(s) de ligação da heparina na MEC, placas previamente cobertas com a própria MEC produzida pelas células, Matrigel ou com fibronectina foram utilizadas para selecionar os possíveis alvos. As células que foram cultivadas e estimuladas sobre o Matrigel não desencadearam esse fenômeno, já as que foram cultivadas somente sobre fibronectina, foram capazes de desencadear o estímulo. Para comprovar que a fibronectina é essencial para esse evento, essa proteína foi silenciada nas células endoteliais utilizando a técnica de RNA de interferência. Quando essas células silenciadas foram estimuladas com heparina, o aumento da síntese de PGHS não ocorreu, comprovando que a fibronectina é a molécula chave da matriz extracelular que a heparina se liga e desencadeia esse fenômeno.

Palavras-chave: Heparina; Proteoglicano de Heparan Sulfato; Matriz Extracelular; Fibronectina.

ABSTRACT

Heparin is a linear and highly anionic polysaccharide, belonging to the family of glycosaminoglycans (GAGs). Its chemical structure is formed of repeating units of disaccharides, which are composed alternately by D-glucosamine (which may be N-sulfated or N-acetylated and 6-O-sulfated), and uronic acid (L-iduronic may present a grouping sulfate 2-O bound or D-glucuronic acid - non sulfated). Thus, heparin high negative charges density is due to uronic acids sulfate and carboxylic groups. The heparan sulfate is another GAG whose chemical composition is very similar to heparin molecule, but with a lower degree of sulfation and greater amount of D-glucuronic acid. These compounds are found covalently linked to protein to form proteoglycans. The heparan sulfate proteoglycan (HSPG), present on the surface of endothelial cells is responsible for maintaining blood compatibility, preventing blood clotting. Thus, this HSPG already have an antithrombotic feature. When endothelial cells (*in vitro*) are incubated with heparin, there is an overexpression of highly sulfated HSPG. It was revealed to be dependent on heparin interaction with extracellular matrix (ECM) leading to MEK/ERK signaling pathway activation. However, the structural requirements of heparin molecule and ECM binding site(s) which is(are) responsible(s) for triggering HSPG synthesis is still unknown. In order to investigate these structural requirements, heparin was subjected to specific chemical modifications and endothelial cells were exposed to these modified molecules. Selective N, 6-O, or 2-O desulfated or carboxy-reduced heparin were able to stimulate HSPG synthesis, although less than unmodified heparin. Totally desulfated heparin did not stimulate HSPG synthesis. Therefore, this stimulus is not dependent solely on a specific sulfate or carboxyl group, but upon the amount of sulfate in heparin. To assess the heparin ECM bidding sites(s), plates previously covered with the own ECM produced by cells (endogenous), matrigel (exogenous MEC), or fibronectin were used to detect possible targets. Cells cultured over Matrigel and later stimulated did not trigger HSPG stimulus. On the other hand, those cultured over endogenous ECM and fibronectin were capable of eliciting this phenomenon. To demonstrate that fibronectin is essential to this event, this protein was silenced in endothelial cells using siRNA. When silenced cells were stimulated with heparin, the increase in HSPG synthesis did not occurred, demonstrating that fibronectin is the key extracellular matrix molecule that heparin binds to and triggers the phenomenon.

Keywords: Heparin; Heparan sulfate Proteoglycan; Extracellular Matrix; Fibronectin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
1.1 GLICOSAMINOGLICANOS.....	10
1.2 PROTEOGLICANOS.....	11
1.2 HEPARINA	12
1.2.1 História da heparina	13
1.2.2 Estrutura química	14
1.2.3 Proteoglicano Serglicim.....	15
1.3 HEPARAM SULFATO	15
1.4 PROTEOGLICANO DE HEPARAM SULFATO ENDOTELIAL	16
1.5 EFEITO DA HEPARINA NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS	17
1.6 HEPARINA E A MATRIZ EXTRACELULAR.....	19
2 JUSTIFICATIVA.....	21
3 OBJETIVOS	22
3.1 GERAL	22
3.2 ESPECÍFICOS	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTA DE COELHO	23
4.2 HEPARINA	23
4.2.1 Modificações químicas	23
4.3 HEPARINA BIOTINILADA.....	24
4.4 HEPARINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS E BIOTINILADAS	24
4.5 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE EM TAMPÃO PDA	24
4.6 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE TAMPÃO PDA PARA HEPARINAS BIOTINILADAS.....	25
4.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS HEPARINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS SOBRE AS CÉLULAS ENDOTELIAIS	25
4.7.1 Síntese de Heparan Sulfato	25
4.8 AVALIAÇÃO DOS COMPONENTES DA MEC QUE SÃO NECESSÁRIOS PARA ESTÍMULO NA SÍNTESE DE HS.	26
4.9 DEPOSIÇÃO DE FIBRONECTINA.....	27

4.10 SILENCIAMENTO DE FIBRONECTINA.....	27
4.11 MARCAÇÃO METABÓLICA DE HS EM CÉLULAS SILENCIADAS PARA FIBRONECTINA.....	28
4.12 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA CONFOCAL.....	28
4.12.1 Ligação da heparina na MEC endotelial.....	28
4.12.2 Imunomarcação para Fibronectina	29
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 HEPARINAS MODIFICADAS E O ESTÍMULO NA SÍNTESE DE HS EM CÉLULAS ENDOTELIAIS	30
5.2. AVALIAÇÃO DOS COMPONENTES DA MEC IMPORTANTES PARA O ESTÍMULO DA SÍNTESE DE HS	35
5.3 AVALIAÇÃO DOS CANDIDATOS NA MEC QUE LIGA A HEPARINA E DESENCADEIA O ESTÍMULO DA SÍNTESE DE PGHS	37
5.4. O SILENCIAMENTO DE FIBRONECTINA LEVA À ABOLIÇÃO DO ESTÍMULO DA SÍNTESE DE PGHS	38
REFERÊNCIAS.....	46
ANEXOS	53

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 GLICOSAMINOGLICANOS

Glicosaminoglicanos (GAGs) são polissacarídeos lineares e carregados negativamente. São formados por unidades dissacarídicas repetitivas compostas, geralmente, por um monossacarídeo não aminado que pode ser um ácido urônico (D-glucurônico ou L-idurônico) ou uma galactose e um monossacarídeo aminado (D-galactosamina ou D-glucosamina). Dependendo da composição dos dissacarídeos e do tipo de ligação entre eles, os GAGs podem ser classificados como: ácido hialurônico (AH) (único não sulfatado), condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), queratam sulfato (QS) (único com galactose), heparam sulfato (HS) e heparina. (GANDHI; MANCERA, 2008; GULATI; POLURI, 2016; VYNIOS; KARAMANOS; TSIGANOS, 2002).

Evolutivamente os GAGs aparecem distribuídos por todo o reino animal. A partir do filo *Cnidária*, o HS está presente em virtualmente todos os animais, o CS também, mas com algumas exceções (*Nemertea* e *Nematoda*). DS e QS nos filos *Urochordata* e *Chordata* e o AH apenas em cordados. Já a heparina é entrada nos filos *Mollusca*, *Annelida*, *Crustacea*, *Urochordata* e *Chordata*. (DEANGELIS, 2002; MEDEIROS et al., 2000).

Mas algumas bactérias como do gênero *Pasturella*, *Eschericia* e *Streptococcus* apresentam cápsulas com um polissacarídeo, que possui unidades dissacarídicas idênticas as encontradas nos GAGs em animais, porém não sulfatadas. Essas estruturas provavelmente são usadas para adesão e como proteção contra o sistema imune do hospedeiro. (revisado por DEANGELIS, 2002).

O AH é o único GAG que a síntese não envolve o sistema endomembranas, em especial o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi. Nesse caso, as enzimas envolvidas na síntese de AH estão localizadas no lado externo da membrana plasmática. Sua unidade dissacarídica é composta por uma *N*-acetil-D-glucosamina e um ácido D-glucurônico. (HASCALL; ESKO, 2009; VIOLA et al., 2015).

O CS é composto pelo dissacarídeo formado pela ligação de uma *N*-acetil-galactosamina e um ácido D-glucurônico, podendo ser sulfatado no carbono 4 e/ou 6 da hexososamina, ainda podendo também apresentar sulfatação no carbono 2 do

ácido D-glucurônico. (MIKAMI; KITAGAWA, 2013; THELIN et al., 2013). Durante a sua biossíntese, o CS pode sofrer uma epimerização no carbono 5 do seu ácido D-glucurônico, que é convertido em ácido L-idurônico, dando origem ao DS. (GULATI; POLURI, 2016; MILLER et al., 2013).

O QS é o único GAG que não apresenta um ácido urônico na sua composição. A sua unidade dissacarídica é composta por uma *N*-acetil-glucosamina ligada a uma galactose. Esses dois açúcares podem apresentar um grupamento sulfato ligado ao carbono 6. (revisado por FUNDERBURGH, 2002; e POMIN, 2015).

Com exceção do AH, todos os demais GAGs são encontrados na natureza, ligados à proteína, formando proteoglicanos.

1.2 PROTEOGLICANOS

Proteoglicanos (PGs) são formados por uma grande variedade de diferentes *core* proteicos com uma ou mais cadeias de GAGs ligados covalentemente, podendo ser de um ou dois tipos de GAGs (nesse caso, são considerados híbridos). (COUCHMAN; PATAKI, 2012; ESKO; KIMATA; LINDAHL, 2009; IOZZO; SCHAEFER, 2015). Como os PGs podem conter diferentes GAGs que possuem sequências sacarídicas, tamanhos e padrões de sulfatação distintos e, além disso, o PG já montado pode sofrer modificações pós-traducionais, faz com que os PGs sejam os biopolímeros encontrados na natureza com a maior diversidade de informação e estruturalmente mais complexos. (LI; LY; LINHARDT, 2012).

Os PGs podem ser encontrados em compartimentos intracelulares, na superfície celular e na matriz extracelular. O único PG intracelular é o Serglicim, que fica armazenado em grânulos secretórios nos mastócitos (será melhor detalhado abaixo). Já os de superfície celular são divididos em dois grupos, os transmembrânicos e os ancorados por GPI (glicosilfosfatidil-inositol). Os PG que foram classificados como extracelulares formam o grupo com o maior número de membros. Esse grupo ainda é dividido em: membrana basal, que estão muito próximos a membrana plasmática das células, ancorados por integrinas ou outros receptores; hialectam/lecticam que possuem em seu *core* proteico um sítio de ligação para AH (*N*-terminal), um para GAGs (região central) e outro para lectinas (C-terminal); e os PGs com *core* proteico pequenos e ricos em leucina (SLRPS), que são sub-divididos em canônicos e não canônicos. Os não canônicos não apresentam nenhum GAG

ligado, mas eles apresentam homologia na cadeia proteica e algumas funções similares, quando comparado com outros membros desse grupo. (revisado por IOZZO; SCHAEFER, 2015). A Tabela 1 resume essa classificação.

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS PROTEOGLICANOS

LOCALIZAÇÃO	CLASSIFICAÇÃO	NOME	GAG PREDOMINANTE
Intracelular	Grânulos secretórios	Serglicim	Heparina
Superfície celular	Transmembrana	Sindecam 1-4	HS
		NG2	CS
		Betaglicam	CS/HS
		Fosfocam	CS
	Ancorados por GPI	Glipicam 1-6	HS
Extracelular	Membrana Basal	Perlecam	HS
		Agrim	HS
		Colágeno XVIII	HS
		Colágeno XV	CS/HS
	Hialectam/Lecticam	Agrecam	CS/QS
		Versicam	CS
		Neurocam	CS
		Brevicam	CS
	Canônico*	Biglicam	CS
		Decorim	DS
		Lumicam	QS
		Fibromodulina	QS
		Queratocam	QS
		Lumicam	QS
		Epificam	DS/CS
	Não canônico*	Podocam	X
		Tsukushi	X

*Os PGs canônicos e não-canônicos são uma sub-classificação de PGs com *core* proteicos pequeno e ricos em leucinas (SLRPS). **HS**: heparina Sulfato; **CS**: condroitim sulfato; **DS**: dermatam sulfato; **QS**: queratam sulfato; **X**: não possuem GAGs ligados.

FONTE: adaptado de IOZZO; SCHAEFER, 2015.

Como os PGs são moléculas abundantes nas células, eles desempenham múltiplas funções, como: controle na atividade de enzimas, interação com receptores de superfície celular, processos de cicatrização, bem como no controle dos gradientes de concentração de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, além de outras implicações. Dada sua importância, disfunções dessas moléculas são observadas em muitas patologias, como diabetes, artrite e câncer, entre muitas outras. (revisado por ESKO; KIMATA; LINDAHL, 2009).

1.2 HEPARINA

A heparina é mundialmente conhecida e amplamente utilizada na clínica médica devido a sua grande atividade anticoagulante. (WARDROP; KEELING,

2008). Segundo a *World Health Organization* (WHO) a heparina é uma das drogas essenciais para a humanidade e faz parte de uma lista de drogas minimamente necessárias para um sistema de saúde básico. (WHO, 2015). Além de sua atividade anticoagulante a heparina também pode apresentar uma ação anti-inflamatória em pacientes com asma, colite, cistite (DAY; LANDIS; TAYLOR, 2004), ajudar no tratamento do câncer (inibindo metástases), melhorando processos de cicatrização e diminuindo a duração do trabalho de parto. (revisado por MULLOY et al., 2016).

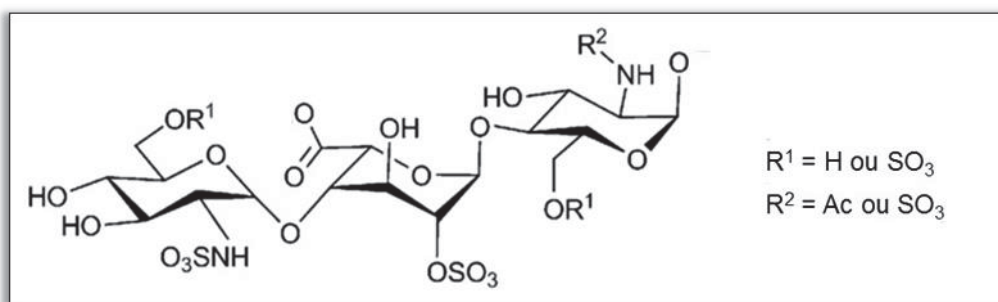
1.2.1 História da heparina

O descobrimento da heparina ocorreu no início do século XX, por Jay McLean e/ou Willian Howell. McLean era um aluno de medicina na *Johns Hopkins Medical School* e trabalhava no laboratório do fisiologista Howell. A linha de pesquisa de Howell envolvia o estudo e purificação de compostos pró-coagulantes. Ele já possuía indícios que um composto extraído de cérebro de cães (chamado de *cephalin*), possuía tal atividade e ele queria que McLean aprimorasse a química da purificação. Em seu artigo de 1916, McLean publicou o seu protocolo de purificação do fosfolípido, cefalina e mais outros dois extraídos do fígado e também do coração. No entanto, para sua surpresa, o extrato obtido a partir do fígado (*heparphosphatide*) e do coração (*cuorin*), não possuíam atividade pró-coagulante, mas sim anticoagulante. Em 1918, Howell e Emmet Holt, isolaram um outro fosfolípido, diferente do isolado por McLean e batizaram de heparina, por ser um composto extraído do fígado (do latim *hepar*). Em 1926, Howell alterou o método de extração e purificação, e obteve um novo composto anticoagulante, que era solúvel em água e continha ácido glucurônico. Possivelmente, esse foi o primeiro extrato bruto de heparina. Na década de 40, Howell era considerado pela comunidade científica, o descobridor da heparina, então McLean começou uma campanha para também ganhar créditos pela descoberta. Os frutos da sua insistência somente apareceram após a sua morte em 1957, pois já no seu obituário foi gravada a frase “descobridor da heparina” e mais tarde, em 1963, foi instalada uma placa na *Jonhs Hopkins* reconhecendo a sua contribuição para a descoberta da heparina, em colaboração com Howell. (REICHLIN, 2012; WARDROP; KEELING, 2008).

1.2.2 Estrutura química

A unidade dissacarídica da heparina é composta por D-glucosamina ligada por ligação α -(1 \rightarrow 4) a um ácido urônico, sendo a maioria (em torno de 90%) de ácido L-idurônico e o restante (aproximadamente 10%) de ácido D-glucurônico (Figura 1). No grupo amina da glucosamina encontra-se ligado um grupo acetil ou sulfato. A glucosamina apresenta ainda grupos sulfatos ligados ao oxigênio do carbono 6 e raramente do carbono 3 e 2. O ácido L-idurônico também pode apresentar 2-O-sulfato ligado. (GANDHI; MANCERA, 2008; MUÑOZ-GARCÍA et al., 2012; RUDD; YATES, 2010).

FIGURA 1 - UNIDADE BÁSICA DA HEPARINA



A hexosamina da heparina é a D-glucosamina, e o monossacarídeo não nitrogenado é o ácido urônico. A figura acima ilustra a unidade básica da heparina, mostrando as possíveis variações nas unidades monossacarídicas. Observe que a glucosamina, pode ser N-sulfatada ou N-acetilada ou, ainda, 6-O-sulfatada, unida por ligação α -(1 \rightarrow 4) ao ácido α -L-idurônico 2-O-sulfatado.

FONTE: adaptado de MUÑOZ-GARCÍA et al., 2012. Licença de uso da figura: 3825620867670 (John Wiley and Sons)

Dietrich e colaboradores (1980) utilizando heparanase e heparitinase II, produzidas por *Flavobacterium heparinum*, demonstraram que a heparina é composta por dissacarídeos dissulfatados e dissacarídeos trissulfatados na proporção de 1:3. (DIETRICH; MICHELACCI; NADER, 1980). Essa presença de vários grupos sulfatos ligados à heparina, aliada aos grupamentos carboxílicos, conferem a essa molécula a maior densidade de carga aniônica que qualquer outra macromolécula biológica conhecida. (JAQUES, 1979). Apresenta em média 3,5 cargas negativas por unidade dissacarídica. (NADER; DIETRICH, 1994). A heparina pode ser encontrada em diversos tecidos e animais, isso faz com que exista uma grande variedade de combinações nos dissacarídeos, fazendo com que a heparina seja estruturalmente heterogênea. Além disso, o modo de purificação pode gerar cadeias diferentes tamanhos. (CASU; NAGGI; TORRI, 2014; SHRIVER et al., 2012).

1.2.3 Proteoglicano Serglicim

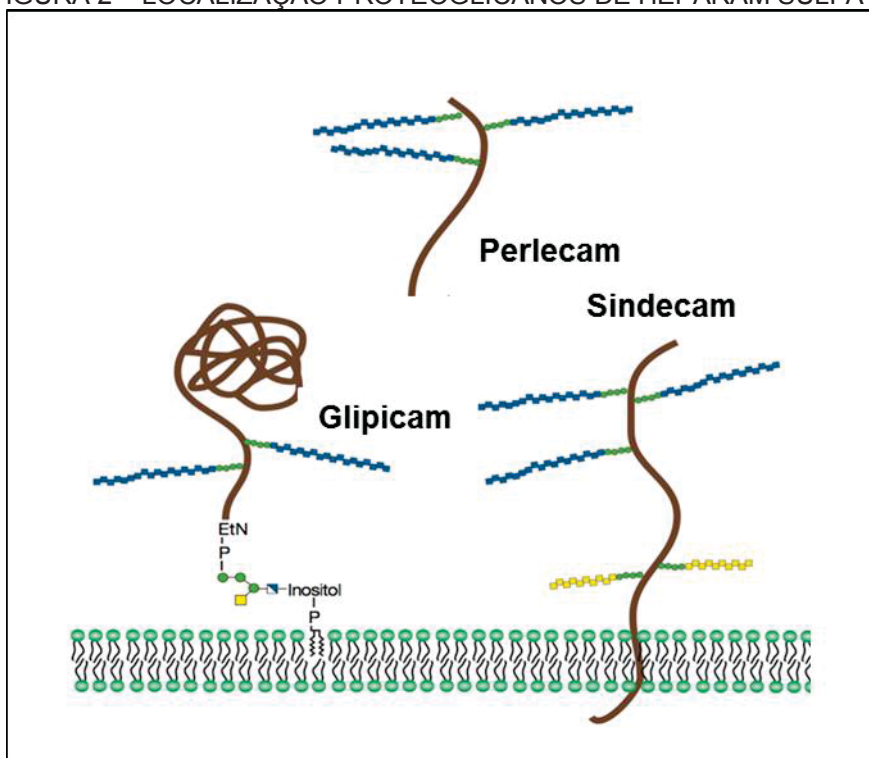
Biologicamente a heparina é encontrada na forma do PG denominado serglicim. Esse é o único PG intracelular, encontrando principalmente nos mastócitos. (GULATI; POLURI, 2016). O serglicim tem a função de manter a morfologia dos grânulos dos mastócitos e contribuir para o armazenamento das proteases. Quando o mastócito degranula, a heparina é responsável por proteger e aumentar a atividade das serino-proteases que são liberadas, porém, não se sabe como a heparina contribui nesse processo inflamatório, causado pela degranulação. (MULLOY et al., 2016). Esse PG também pode ser encontrado em outras células, como: *Natural Killer*, plaquetas, macrófagos, endoteliais, condrócitos e musculares lisas, porém sem heparina e com cadeias de condroitim sulfato. (KOLSET; PEJLER, 2011; KORPETINO et al., 2014; SCULLY et al., 2012).

1.3 HEPARAM SULFATO

O heparam sulfato foi isolado, em 1948, por Jorpes e Gardell (1948), como sendo uma heparina de baixa atividade anticoagulante. Os heparans sulfatos exibem maior variedade estrutural, quando comparado com a heparina. São formados por dissacarídeo composto por um ácido urônico (sendo o ácido D-glucurônico de 50-70% ou o ácido L-idurônico de 30-50%), que pode apresentar um grupo sulfato 2-O ligado ao ácido L-idurônico e uma glucosamina, que pode ser N-sulfatada ou N-acetilada e/ou O-sulfatada. Vale salientar que com todas essas variáveis é possível obter 48 tipos diferentes de dissacarídeos, porém somente 23 deles são encontrados na natureza. (ESKO; SELLECK, 2002).

Os PG de HS podem ser encontrados ligados à membrana plasmática por GPI (glicosilfosfatidilinositol), chamados glipicans ou transmembrânicos, os sindecans. Também podem estar depositados na MEC (perlecan, agrin, biglican e colágeno XVIII). (ESKO; KIMATA; LINDAHL, 2009; IOZZO; SCHAEFER, 2015; KIRKPATRICK; SELLECK, 2007). A Figura 2 ilustra a localização dos PGHS.

FIGURA 2 – LOCALIZAÇÃO PROTEOGLICANOS DE HEPARAM SULFATO



Os proteoglicanos de heparano sulfato podem ser transmembrânicos (sindecam), ancorados na membrana por meio de GPI (glipicam) ou serem componentes da matriz extracelular (perlecan, agrin, biglicam e colágeno XVIII). Em marrom estão representados os *cores* proteicos, em azul as cadeias de HS. **FONTE:** adaptado de ESKO; KIMATA; LINDAHL, (2009). Copyright © 2009, The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California

Além disso, já foram também encontrados PGHS no núcleo de alguns tipos celulares, possivelmente atuando como um controlador da expressão gênica e na proliferação celular. Porém, como o PGHS entra no núcleo e modula essas funções, ainda não está bem definido. (KOVALSZKY; HJERPE; DOBRA, 2014; STEWART; SANDERSON, 2013).

Os PGHS podem atuar de diversas maneiras: a) ligando-se a citocinas e fatores de crescimento, e protegendo-os da degradação; b) como co-receptores para receptores de fatores de crescimento, associados a tirosina quinase; c) como receptores em alguns processos de endocitose. (KIM; TURNBULL; GUIMOND, 2011; SARRAZIN; LAMANNA; ESKO, 2011).

1.4 PROTEOGLICANO DE HEPARAM SULFATO ENDOTELIAL

As células endoteliais possuem um PGHS na sua superfície que foi classificado como Sindecam 4 (GenBank: ADM21327.1). Foi verificado que esse

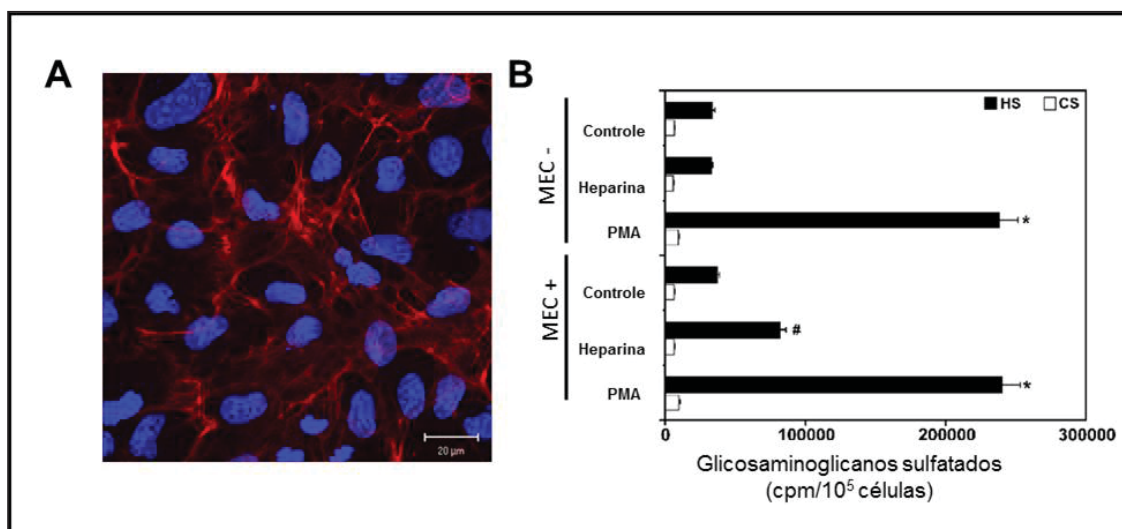
PGHS apresenta um efeito inibitório na coagulação sanguínea. (COLBURN; BUONASSISI, 1982; SHWORAK et al., 2010). Nader e colaboradores (1987) demonstraram, que esse PGHS contém quantidades significativas do dissacarídeo trissulfatado, característico da molécula de heparina, mostrando que na realidade este composto é um copolímero de heparam sulfato e heparina. De modo semelhante a heparina, as cadeias sacarídicas desse PGHS secretado pelas células endoteliais podem se ligar a antitrombina III (AT), formando um complexo que aumenta a atividade da AT, inibindo fatores pró-trombóticos (trombina, fatores IXa e Xa) e, conseqüentemente, a coagulação sanguínea. (DE AGOSTINI et al., 1990; KNELSON; NEE; BLOBE, 2014).

1.5 EFEITO DA HEPARINA NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS

As células endoteliais, em cultura, quando são expostas a heparina, estimulam de 2 a 3 vezes a síntese do PGHS de maneira específica e aumentam a proporção do dissacarídeo trissulfatado. (NADER et al., 1989). No entanto, a heparina não estimulou a síntese de PGHS em células musculares lisas de aorta de coelho mostrando ser célula específica. (NADER et al., 1989; PINHAL et al., 1994). Utilizando fragmentos da molécula de heparina, obtidos por degradação enzimática (heparanase e heparitinases), foi demonstrado que o fragmento mínimo de heparina necessário para estimular a síntese de PGHS era um tetrassacarídeo pentassulfatado. (NADER et al., 2001; PINHAL et al., 1995)

Para investigar o sítio de ligação da heparina nas células endoteliais, que são responsáveis pelo aumento da síntese de PGHS, Trindade e colaboradores (2008a), utilizando heparinas biotiniladas, demonstraram que o sítio de ligação da heparina em células endoteliais é a MEC (Figura 3A). Outro dado importante é que células em suspensão e tratadas com heparina, não estimularam a síntese de PGHS, já as que estavam em cultura (aderidas) e foram tratadas com heparina foram capazes de estimular a síntese, mostrando que a MEC é importante para estimular a síntese (Figura 3B).

FIGURA 3 – LIGAÇÃO DA HEPARINA NA MATRIZ EXTRACELULAR



A- Heparina se liga na matriz extracelular. Em azul é visualizado o núcleo marcado com DAPI e em vermelho a heparina biotinilada. **B-** Células em suspensão (MEC -) não são estimuladas na presença da heparina. Já as células aderidas (MEC +) e tratadas com heparina ocorre o estímulo da síntese de PGHS. **FONTE:** Adaptado de Trindade et al (2008a). Licença de uso da figura: 3825611234700 (*John Wiley and Sons*)

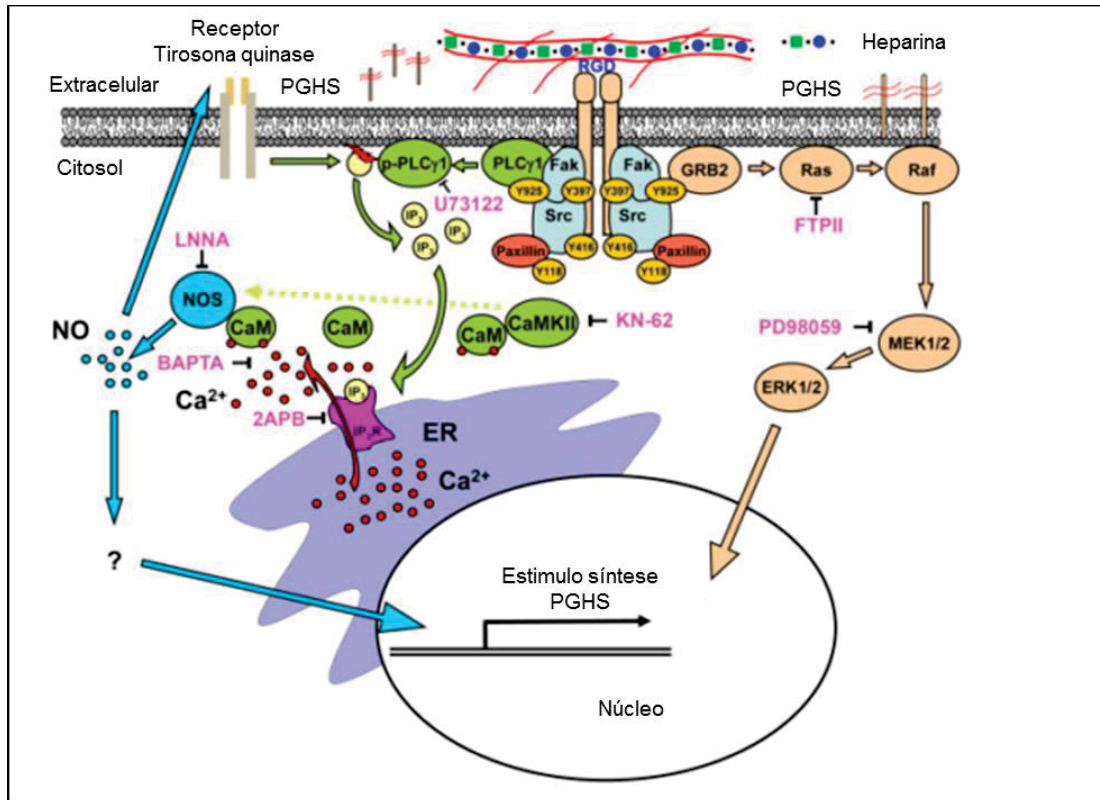
Em outro artigo Trindade e colaboradores (2008b) demonstraram que as células endoteliais são capazes de internalizar heparina, mas essas são direcionadas para lisossomos. No entanto, foi verificado que mesmo bloqueando a degradação lisossomal, com cloroquina, ou evitando sua internalização (a 4 °C), o efeito que a heparina causa sobre a síntese do proteoglicano de heparan sulfato é mantido. Esse conjunto de resultados mostram que o estímulo da síntese de PGHS é decorrente da ligação da heparina na matriz extracelular, mostrando que esse composto não precisa ser endocitado para causar este fenômeno.

Sabendo que o sítio de ligação da heparina nas células endoteliais é a MEC, Medeiros et al, (2012) investigaram como essa ligação ativava o processo de sinalização intracelular (Figura 4) que resultam no aumento do estímulo da síntese de PGHS. Para tanto, as células foram estimuladas com heparina, na presença do peptídeo RGD (Arginina – Glicina – Aspartato), o qual bloqueia a interação da integrina com componentes da MEC. Observaram que resultaram no bloqueio do efeito da heparina e, dessa forma, demonstrando que o estímulo da síntese de PGHS eliciada pela heparina, é dependente de integrina, a qual leva para a fosforilação de FAK (quinase de adesão focal). Essa fosforilação de FAK desencadeia dois sinais nas células endoteliais que levam ao estímulo da síntese do PGHS:

- Ativação da via Ras / Raf / MEK / ERK;

- Ativa a fosfolipase C γ (PLC γ), que irá atuar liberando Ca²⁺ e aumenta a produção de NO (óxido nítrico).

FIGURA 4 – MECANISMO DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR CAUSADO PELA HEPARINA PARA ESTIMULAR A SÍNTESE DE PGHS



Cascata de sinalização intracelular, proposta por Medeiros, et al (2012), que leva ao estímulo da síntese de PGHS mostra que para que aconteça esse fenômeno, a heparina se liga a alguma molécula da MEC, que expõe o seu sítio RGD para interagir com integrinas. Essa interação fosforila FAK (quinase de adesão focal) que pode ativar duas vias. Uma dessas vias é a via Ras/Raf/MEK/ERK. A outra via, ativa fosfolipase C γ (PLC γ), que produzirá IP₃ (inositol trifosfato), que se liga ao retículo endoplasmático (ER), ligando Ca²⁺ no citoplasma. Essa liberação de Ca²⁺ leva a produção de NO (óxido nítrico). A ativação dessas duas vias leva ao aumento da síntese do PGHS. **FONTE:** Adaptado de Medeiros, et al (2012). Licença de uso: 3825940353429 (John Wiley and Sons).

1.6 HEPARINA E A MATRIZ EXTRACELULAR

Todos os tecidos e células possuem, ao seu redor, uma mistura de componentes, organizado e que são altamente dinâmicos, chamados de matriz extracelular (MEC). Além de prover um suporte mecânico para as células, pode influenciar na sua sobrevivência, diferenciação, morfologia, polaridade e migração. A MEC pode ser classificada em dois grupos: intersticial e pericelular. A matriz intersticial está localizada ao redor das células e a pericelular é a MEC que fica em contato com as células, um exemplo deste tipo de MEC é a membrana basal.

(FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010; KOSTOUROU; PAPALAZAROU, 2014; THEOCHARIS et al., 2016).

A MEC é composta por: proteoglicanos (agrim, perlecan, colágenos XV e XVIII), proteínas fibrosas (fibronectina, colágenos, elastinas, lamininas) e proteínas não fibrosas (tenascina, trombospondina, vitronectina, nidogênio/entactina). (KIM; TURNBULL; GUIMOND, 2011; LEBLEU; MACDONALD; KALLURI, 2007). Essa composição varia de um tipo celular para outro.

As células endoteliais possuem uma MEC composta principalmente por fibronectina, colágeno IV e XVIII, laminina (411 e 511), nidogênio/entactina e perlecan. (KOSTOUROU; PAPALAZAROU, 2014). O banco de dados *online MatrixDB* (CHAUTARD et al., 2009) mostra que a heparina pode interagir com 150 componentes da MEC, sendo que das moléculas presentes na MEC do endotélio, a heparina interage com a fibronectina e colágeno IV.

2 JUSTIFICATIVA

Embora seja conhecido que a MEC é o local de ligação da heparina, ainda não se sabe qual, ou quais, moléculas da MEC a heparina se liga e, conseqüentemente, desencadeia o mecanismo de estímulo da síntese de HS.

Por outro lado, não são conhecidos os requisitos estruturais da molécula da heparina que são necessários nessa ligação para desencadear o estímulo para a síntese de HS. Buscando trazer novas contribuições, recentemente Bastos (2011) realizou modificações químicas na molécula da heparina e obteve moléculas com diferentes quantidades de sulfatação, bem como parcialmente carboxirreduzida. Foi observado que o estímulo da síntese de PGHS é proporcional ao grau de sulfatação. No entanto, como a dessulfatação realizada foi aleatória (qualquer sulfato, em qualquer posição foi removido, apenas respeitando o tempo da reação) ainda permanece obscuro se esse fenômeno é simplesmente decorrente das cargas negativas presentes na heparina, ou se é referente aos grupamentos sulfatos, ou, ainda, se é conformação em que as cargas negativas ou os grupamentos sulfatos, estão dispostos espacialmente na molécula.

Para responder essa pergunta seria interessante realizar modificações pontuais, como em *N*- e/ou em 6-*O*-sulfato da glucosamina e em 2-*O* sulfato do ácido idurônico, bem como desenvolver moléculas totalmente desprovidas de sulfato. Recentemente, essas moléculas, bem como a heparina totalmente carboxirreduzida, foram obtidas e essas modificações foram confirmadas, inclusive por RNM. (ROSSI, 2013). Agora, o presente trabalho buscou utilizar essas moléculas para entender quais são os requisitos estruturais da heparina, investigando se esse estímulo depende da posição do sulfato, da carboxila, da quantidade de grupamentos sulfato ou carga líquida total, ou ainda, se é devido a alterações conformacionais ocasionadas pela remoção dos sulfatos ou carboxila. Além disso, busca investigar em qual(is) molécula(s) de matriz extracelular a heparina se liga para estimular a síntese de PGHS.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Avaliar os requisitos estruturais da molécula de heparina, que são responsáveis pelo estímulo da síntese do PGHS em células endoteliais, bem como em qual(is) componente(s) da matriz extracelular ocorre sua ligação e desencadeia tal fenômeno.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar se o estímulo da síntese do PGHS em células endoteliais, causados pela heparina, é decorrente dos grupamentos sulfato (sulfato de uma forma geral, ou especificamente ligado nas posições *N*, ou 6-*O* da glucosamina ou em 2-*O* do ácido idurônico) ou do grupamento carboxílico do ácido urônico;
- Correlacionar a redução do estímulo da síntese de PGHS, com a ausência da ligação em molécula específica na MEC;
- Identificar qual(is) molécula(s) da MEC endotelial que liga heparina e que é(são) responsável(is) por desencadear o estímulo da síntese de PGHS.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTA DE COELHO

As células endoteliais utilizadas neste estudo foram estabelecidas a partir da aorta de coelho (BUONASSISI, 1973) e cedidas pela Prof. Dra. Helena Nader. Essas células foram cultivadas em meio F-12 (catálogo 21700075, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) contendo bicarbonato de sódio (catálogo 25080094, Thermo Fisher Scientific) (1,18 g/L) e penicilina/estreptomicina (catálogo 15140-122, Thermo Fisher Scientific), respectivamente 10.000 U e 10 mg para cada litro de meio. O meio foi suplementado com 10% de soro feral bovino (catálogo 12657-029, Thermo Fisher Scientific) (SFB). Para o subcultivo foi utilizada a enzima viocase (pancreatina) (catálogo P3292-100G, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) para a desadesão das células. Essas células foram mantidas em incubadora a 37 °C, sob atmosfera úmida e tensão de 2,5% de CO₂.

4.2 HEPARINA

No presente trabalho foi utilizada a heparina não fracionada, obtida de mucosa suína (Biolberia, Barcelona, Espanha), cedida pela Profa. Dra. Helena Bonciani Nader.

4.2.1 Modificações químicas

As modificações químicas já foram previamente realizadas e comprovadas por ressonância magnética nuclear (em anexo). (ROSSI, 2013). As modificações químicas realizadas foram:

- *N*-dessulfatação da glucosamina (DNS);
- 6-*O*-dessulfatação da glucosamina (D6OS);
- 2-*O*-dessulfatação do ácido urônico (D2OS);
- *N*-dessulfatação da glucosamina e 2-*O*-dessulfatação do ácido urônico (DN2OS);
- Dessulfatação total (DNOS);
- Carboxirredução no ácido urônico (CR).

4.3 HEPARINA BIOTINILADA

A conjugação da molécula de biotina à heparina foi realizada conforme descrito por Trindade e colaboradores (2008a). Brevemente, cerca de 10 mg de heparina e 5,16 mg de EZ-Link biotina-hidrazida (catálogo 21339, Thermo Fisher Scientific) foram dissolvidos em 20 mL de solução de HCl 0,1 M, pH 4,8. A seguir, foram adicionados 3,83 mg de EDAC (cloridrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida) (catálogo E2247, Thermo Fisher Scientific) e a reação foi monitorada em pHmetro, sendo mantido o pH da reação em 4,8 pela adição (gota a gota) de HCl 0,01 M por 5 min sob agitação contínua. A reação foi interrompida pela adição de acetato de sódio 0,5 M (concentração final), pH 4,8 por 60 min. A solução foi então dialisada contra água destilada, utilizando-se membrana com permeabilidade a moléculas de até 8 kDa e liofilizada.

4.4 HEPARINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS E BIOTINILADAS

Cerca de 1 mg de cada uma das heparinas quimicamente modificadas (DNS, D6OS, D2OS, DN2OS, DNOS e CR) e 0,516 mg de EZ-Link biotina hidrazida foram dissolvidas em 5 mL de solução de HCl 0,1 M pH 4,8. A seguir, foi adicionado 0,383 mg de EDAC e a reação foi monitorada em pHmetro, sendo mantido o pH pela adição (gota a gota) de HCl 0,01 M por 5 minutos (a CR permaneceu reagindo por 30 minutos) sob agitação constante. O restante do procedimento foi realizado conforme descrito no item anterior.

4.5 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE EM TAMPÃO PDA

A identificação dos GAGs foi realizada por eletroforese em gel de agarose (catálogo 1620100, Bio-Rad, Hercules, Califórnia, Estado Unidos) (a 0,55 %) em tampão PDA (1,3 – diaminopropano acetato) 0,05 M (diaminopropano, catálogo 33260, Sigma-Aldrich), pH 9,0. (DIETRICH; DIETRICH, 1976). Foram aplicados 5 µL de cada amostra no gel e a corrida foi realizada por 2 horas com corrente elétrica constante de 80 mA a 5 °C. Após a corrida eletroforética, as amostras foram precipitadas com o detergente catiônico cetavlon (catálogo 1023421000, Merck-Millipore, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos) (0,1 %) por 2 horas, os géis foram secos sob ventilação e calor, sendo posteriormente corados com azul de

toluidina 0,1 % (catálogo 22050, Electron Microscopy Sciences – EMS, Hatfield, Pensilvânia, Estados Unidos) em ácido acético 1 % e etanol 50 % e descoradas com a mesma solução, sem o corante.

4.6 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE TAMPÃO PDA PARA HEPARINAS BIOTINILADAS

Para confirmar o processo de biotinilação das heparinas quimicamente modificadas, foi realizada uma eletroforese em tampão PDA, como descrito no item anterior. Porém, ao final da corrida, o conteúdo do gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose conforme descrito por Trindade (2000). Após a corrida eletroforética, foram colocados sobre o gel, uma membrana de nitrocelulose, dois pedaços de papel Whatman 3 mm, uma camada de papel absorvente, uma lâmina de vidro e por fim um peso, para que a transferência ocorresse por capilaridade. A seguir, a membrana de nitrocelulose foi bloqueada utilizando uma solução de 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) diluído em PBS por duas horas sob agitação. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens de 5 minutos cada com PBS e a membrana foi incubada com estreptavidina conjugada com peroxidase (catálogo 200-032-211, Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pensilvânia, Estados Unidos) diluída em PBS (concentração final 0,4 µg/mL) por 1 hora sob agitação. A membrana foi revelada com DAB (3,3'-Diaminobenzidina) (catálogo 13060, EMS) 0,5 mg/mL diluído em PBS com adição de 30 µL de água oxigenada para cada 10 mL de solução de DAB. Para interromper a reação, a membrana foi lavada 5 vezes com água ultrapura.

4.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS HEPARINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS SOBRE AS CÉLULAS ENDOTELIAIS

4.7.1 Síntese de Heparan Sulfato

Após a desadesão celular (realizado como habitual para o subcultivo), 6×10^4 células foram adicionadas em cada poço, de placas de *multiwell* (24 poços) e cultivadas até atingirem a confluência (3 dias). A seguir, foram lavadas 3 vezes com tampão EBSS (solução salina equilibrada de Earl), e foi adicionado meio de cultura F-12 sem SFB, contendo 150 µCi/mL de [^{35}S]-sulfato de sódio (catálogo S35SR,

Polaton, Otwock, Polônia), na presença ou ausência (controle), de heparina ou heparinas quimicamente modificadas (100 µg/mL), sendo mantidas por 18 horas em cultura. A seguir, o meio de cultura foi coletado e o extrato celular foi obtido pela “lise” das células, após raspagem da placa com o auxílio de um rodinho (scraper), em tampão Tris-HCl 125 mM, pH 8,00 contendo 7 M de uréia e novamente, com a lavagem da placa com o mesmo tampão, mesmo volume inicial, sem uréia e coleta em mesmo tubo (assim, a concentração final de uréia ficou em 3,5 M).

Após proteólise - incubação com maxatase (Biocon do Brasil Indústria Ltda, Vinhedo, Brasil) 4 mg/mL em tampão Tris-HCl 125 mM pH 8,0 a 60 °C *overnight* -, alíquotas do meio de cultura e do extrato celular foram analisadas por eletroforese em gel de agarose, conforme descrito no item 4.5. Após a corrida eletroforética, as amostras foram analisadas e quantificadas pela exposição do gel a um filme radiosensível, que excita íons de fósforo. A seguir, o filme sensibilizado foi submetido à varredura a laser no aparelho Cyclone (PerkinElmer, Waltham, EUA), um *fosfoimage*, que faz a leitura do fósforo excitado e quantifica como unidade de luminescência, a qual varia de acordo com o grau de excitação, gerando imagens das bandas contendo material radioativo incorporado nos GAGs. Com base nas imagens obtidas, as respectivas bandas dos GAGs (HS e CS) nos géis foram recortadas e transferidas para tubos contendo o líquido de cintilação *UltimaGold* (catálogo 6013329, PerkinElmer), os quais foram quantificados no contador de Cintilação (modelo 2100TR/2300TR, da PerkinElmer). Os valores obtidos foram normalizados pela quantidade de proteínas de cada amostra. A dosagem de proteínas foi realizada utilizando o kit BCA *Pierce* (catálogo 23227, Thermo Fisher Scientific).

4.8 AVALIAÇÃO DOS COMPONENTES DA MEC QUE SÃO NECESSÁRIOS PARA ESTÍMULO NA SÍNTESE DE HS.

Para realizar esse experimento, placas *multiwell* de 24 poços foram previamente preparadas da seguinte maneira:

- Cobertura com MEC previamente produzida pelas células endoteliais: foram plaqueadas 6×10^4 células endoteliais e cultivadas por 3 dias para que ocorresse a produção de MEC. Após o período necessário, as células

foram removidas com o uso de *scraper*, restando apenas a MEC produzida por elas;

- Cobertura com Fibronectina: os poços foram recobertos com 5 µg/cm² de fibronectina purificada de plasma humano (catálogo 33016-015, Thermo Fisher Scientific), um dia antes do experimento e mantidas *overnight* à 4°C.
- Cobertura com Matrigel: os poços foram cobertos com 5 µg/cm² Matrigel (catálogo 356234, BD Biosciences, Franklin Lakes, Nova Jersey, Estados Unidos), duas horas antes do experimento a temperatura ambiente.
- Placa controle: sem cobertura prévia adicional.

Após a obtenção das placas, as células foram plaqueadas (2x10⁵ células) (em cada placa específica) na presença ou ausência (controle) de heparina (100 µg/mL) e na presença de 150 µCi/mL de [³⁵S]-sulfato de sódio, em meio F-12 livre de SFB e foram mantidas por 3 horas em cultura. Após o período de incubação, foram realizados os procedimentos para obtenção dos GAGs, tanto da fração celular, quanto do meio de cultura, conforme descrito anteriormente. Apenas a quantificação que foi realizada da seguinte forma: a imagem obtida do filme radiosensível foi analisada utilizando o *software* Fiji (SCHINDELIN et al., 2012).

4.9 DEPOSIÇÃO DE FIBRONECTINA

Células endoteliais de aorta de coelho (10⁴ células) foram cultivadas sobre lamínulas circulares de 12 mm de diâmetro, por 3 e 6 horas, na ausência ou na presença de 10% de SFB. Em seguida, o material foi processado com descrito no item 4.12.

4.10 SILENCIAMENTO DE FIBRONECTINA

As sequências dos siRNA (adquiridas da Dharmacon, Lafayette, Colorado, Estados Unidos) utilizadas para esse experimento foram:

5'-ACA ACG GUG UGA ACU ACA A – 3'

3'-UGU UGC CAC ACU UGA UGU U – 5'

Como controle foi utilizado o *Non targeting siRNA* (Dharmacon).

Antes do experimento, o siRNA foi diluído em meio de cultura F-12 (sem adição de SFB e antibióticos). Em outro tubo, o reagente de transfecção DharmaFECT 1 (Dharmacon), também foi diluído em meio de cultura F-12 (sem

adição de SFB e antibióticos). Então o conteúdo dos dois tubos foi misturado e incubado por 20 minutos, a temperatura ambiente.

Para a realização dessa técnica, 6×10^4 células foram cultivadas em placas *multiwells* de 24 poços por 6 horas em meio F-12 suplementado com 10% de SFB e sem antibióticos. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com EBSS e foi adicionada a solução contendo o siRNA em meio de cultura F-12 com SFB (na ausência de antibióticos) e as células permaneceram em cultura por mais 3 dias. A concentração final do siRNA e do DharmaFECT 1, em cada poço foi (volume final 500 μ L), respectivamente, de 100 nmol/mL e 1 μ L. O silenciamento foi confirmado por imunofluorescência, como descrito no item 4.12.

4.11 MARCAÇÃO METABÓLICA DE HS EM CÉLULAS SILENCIADAS PARA FIBRONECTINA

Para este ensaio foram plaqueadas 6×10^4 células/poço em placas *multiwells* de 24 poços. Após 6 horas de cultura, as células foram transfectadas com o siRNA (100 nmol/mL), e então mantidas em cultura por mais 72 horas (3 dias) como descrito anteriormente no item 4.10. A seguir, as células foram lavadas 3 vezes com EBSS, e foi adicionado meio de cultura F-12 sem SFB, contendo 150 μ Ci/mL de [35 S]-sulfato de sódio, na presença ou ausência, de heparina (100 μ g/mL), sendo os mesmos mantidos por 18 horas em cultura. O restante do experimento foi realizado como descrito anteriormente.

4.12 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA CONFOCAL

4.12.1 Ligação da heparina na MEC endotelial

As células foram cultivadas em lâminulas circulares de 13 mm de diâmetro em uma concentração de 10^4 células e mantidas em placas de *multiwell* (24 poços) por 3 dias. Em seguida, as células foram lavadas com meio de cultura F-12 (na ausência de SFB) gelado e incubadas por 1 hora a 4 °C com heparina biotinizada ou heparinas quimicamente modificadas e biotinizada (100 μ g/mL) em F-12. Ao final da incubação, as células foram lavadas com PBS e fixadas com 2% de paraformaldeído (catálogo 15714, EMS) em PBS por 20 min, a temperatura ambiente. Após a fixação, foi realizado o bloqueio de radicais aldeídicos livres (decorrentes da fixação),

lavando as células com 0,1 M de glicina (catálogo G8898, Sigma-Aldrich). As diferentes heparinas biotinilada foram reveladas incubando as células com estreptavidina conjugada com Alexa Fluor 594 (catálogo 200-582-211, Jackson ImmunoResearch) diluída em PBS (concentração final 6 µg/mL) por 40 minutos, a temperatura ambiente. As lâminas foram montadas utilizando o meio de montagem ProLong Gold - contendo DAPI (catálogo P36930, Thermo Fisher Scientific) e visualizadas no microscópio de varredura a laser confocal A1RSi+MP (Nikon, Minato, Tóquio, Japão). As imagens foram processadas utilizando o *software* Fiji.

4.12.2 Imunomarcação para Fibronectina

As células foram cultivadas como descrito anteriormente. Em seguida, foi realizado um bloqueio dos sítios de interação inespecíficos, utilizando 1% de BSA em PBS, por 10 minutos a 4 °C. A seguir, as células foram incubadas com anticorpo primário anti-fibronectina (IgY de galinha) (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Silvio Marques Zanata, UFPR) (concentração final 2 mg/mL), diluído em meio F-12, contendo 1% de BSA. Ao final do período de incubação, as células foram fixadas como habitual, seguido do bloqueio dos radicais aldeídicos livres (conforme descritos anteriormente). O material foi incubado com anticorpo secundário, anti-IgY de galinha conjugado com peroxidase produzido em coelho (catalogo A9046, Sigma), diluído 1:200 em PBS por 40 minutos. Posteriormente, as lamínulas foram incubadas com anti-IgG de coelho conjugada com *Texas Red* (catálogo 111-075-003, Jackson ImmunoResearch) ou conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (catálogo F-0382, Sigma-Aldrich) diluídos em PBS na concentração final de 1:200 e 1:100, respectivamente. As lâminas foram montadas e analisadas como descrito anteriormente.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados pelo em três ensaios independentes. Os gráficos foram elaborados utilizando o modelo de dispersão, com o valor das medianas de cada experimento e a análise estatística foi realizada, utilizando o teste não paramétrico *Mann-Whitney*, como sugerido por Weissgerber et al., (2015).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

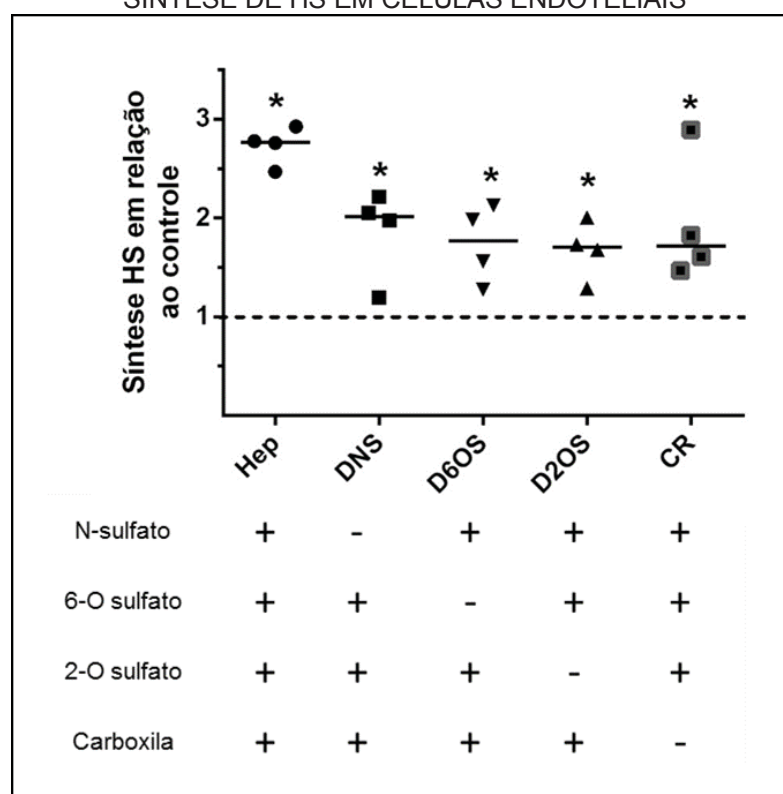
5.1 HEPARINAS MODIFICADAS E O ESTÍMULO NA SÍNTESE DE HS EM CÉLULAS ENDOTELIAIS

Para avaliar os requisitos estruturais da molécula de heparina, previamente esse composto sofreu modificações químicas específicas, para remoção de grupamentos sulfato em posições específicas, sendo *N* ou 6-*O*-sulfato ligado à glucosamina ou 2-*O*-sulfato, ligado ao ácido urônico. Ainda, foi realizada uma remoção dupla, sendo *N* e 2-*O*-sulfato e, por último, a totalmente dessulfatada. Todas essas modificações químicas foram realizadas conforme descrito por Yates e colaboradores (1996) foram confirmadas por Ressonância Nuclear Magnética (dados em anexo).

Para avaliar o efeito das heparinas modificadas sobre o estímulo da síntese de HS, células confluentes foram expostas ou não à heparina não modificada e/ou heparinas quimicamente modificadas, na presença de [³⁵S]-sulfato de sódio e foram mantidas em cultura por 18 horas, conforme descrito em Material e Métodos. Como esperado, a heparina não modificada resultou em 170% de estímulo da síntese de HS, em relação ao controle. As heparinas que sofreram apenas uma modificação pontual, seja *N*-dessulfatada (DNS) ou 6-*O* da glucosamina (D6OS) ou 2-*O* do ácido L-idurônico (D2OS) ou carboxirreduzida (CR), continuaram capazes de estimularem significativamente a síntese de HS (Figura 5), no entanto, de forma menos intensa. O estímulo da produção de HS causado pela heparina *N*-dessulfatada (DNS) foi de aproximadamente 100% (em relação ao controle), já o estímulo causado pelas D6OS, D2OS e CR foi de aproximadamente 70%, 77% e 75%, respectivamente. Esses dados mostram que a remoção específica dos grupamentos sulfato, não aboliu o estímulo da síntese, revelando que não há um grupo sulfato em específico (*N* ou 6-*O*-sulfato ligado à glucosamina ou 2-*O*-sulfato, ligado ao ácido urônico), que seja aquele responsável por esse fenômeno. As carboxilas presentes nos ácidos urônicos, também não se mostram importantes para o estímulo, devido ao fato que mesmo após a sua remoção o estímulo continuou a ocorrer. Trindade (2000) demonstrou que uma heparina contendo todas as carboxilas substituídas por biotina (heparina 100% biotinilada) foi capaz de estimular a síntese de HS, de forma similar à heparina não modificada, o que reforça que a carboxila não é importante para o

processo. Por outro lado, nesse trabalho observamos que houve uma redução da capacidade de estímulo da síntese de HS de 170% para 70%, o que é similar as heparinas com remoção de grupamentos sulfato ligados em uma posição em específico. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que fato de que, a reação de carboxirredução levou a perda parcial de grupamentos sulfato (aproximadamente 40% de redução – dados não mostrados). Células endoteliais estimuladas com dextram sulfato, um açúcar que não possui ácidos carboxílicos na sua estrutura, também foi capaz de estimular a síntese de HS. (NADER et al., 2004, 2001; PINHAL et al., 1994).

FIGURA 5 – EFEITO DAS HEPARINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS NO ESTÍMULO DA SÍNTESE DE HS EM CÉLULAS ENDOTELIAIS

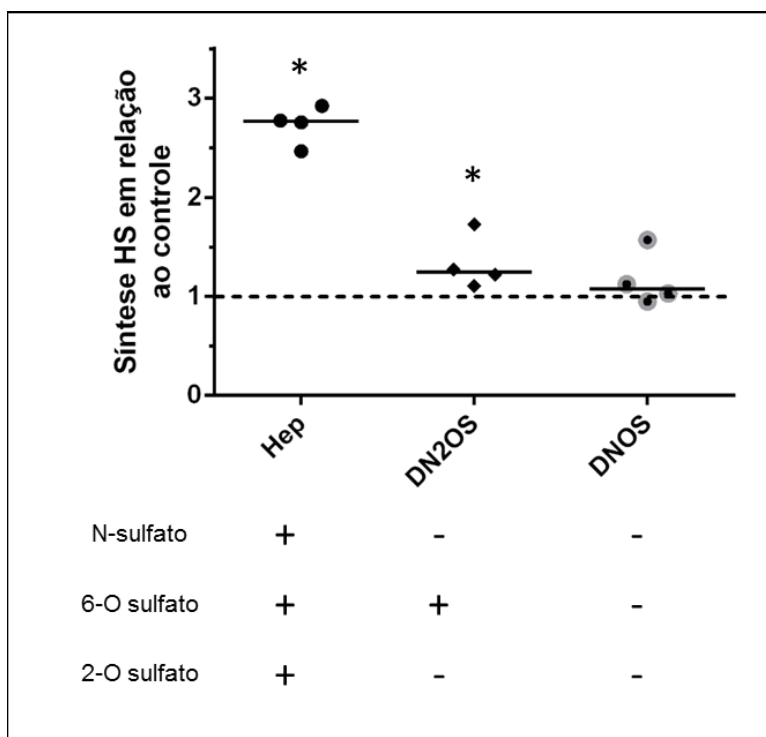


As células foram cultivadas em meio de cultura F-12 com 10% SFB por 3 dias e então foram expostas a 100 µg/mL de heparina não modificada ou quimicamente modificadas, na presença de 150 µCi/mL de [³⁵S]-sulfato de sódio por 18 horas. Alíquotas do meio de cultura foram submetidas a proteólise, sendo posteriormente analisadas por eletroforese em gel de agarose (0,55%) em tampão PDA, conforme descrito em Material e Métodos. **Hep**: Heparina não modificada; **DNS**: Heparina N-dessulfatada; **D6OS**: heparina 6-O-dessulfatada; **D2OS**: heparina 2-O-dessulfatada; **CR**: heparina carboxirreduzida. Cada ponto representa a mediana de um experimento realizado em triplicata e as barras correspondem ao valor da mediana entre os quatro experimentos. Teste estatístico realizado *Mann Witheney*, * p<0,05, **FONTE**: O autor (2016)

Para investigar a importância dos grupamentos sulfatos, em geral, no estímulo da síntese, foi realizada uma dupla remoção de sulfatos, N- e 2-O-ligados

(DN2OS), e uma dessulfatação total da molécula de heparina (DNOS). Os resultados do efeito sobre a síntese do HS estão ilustrados na Figura 6.

FIGURA 6 – EFEITO DAS HEPARINAS QUIMICAMENTE DESSULFATADAS NO ESTÍMULO DA SÍNTESE DE HS EM CÉLULAS ENDOTELIAIS



As células foram cultivadas em meio de cultura F-12 com 10% SFB por 3 dias e então foram expostas a 100 µg/mL de heparina não modificada ou quimicamente dessulfatadas, na presença de 150 µCi/mL de [³⁵S]-sulfato de sódio por 18 horas. Alíquotas do meio de cultura foram submetidas a proteólise e foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (0,55%) em tampão PDA, conforme descrito em Material e Métodos. **Hep**: Heparina não modificada; **DN2OS**: heparina N- e 2-O dessulfatada, **DNOS**: heparina totalmente dessulfatada. Cada ponto representa a mediana de um experimento realizado em triplicata e as barras correspondem ao valor da mediana entre os quatro experimentos. Teste estatístico realizado *Mann Witheney*, * p<0,05. **FONTE: O autor (2016)**

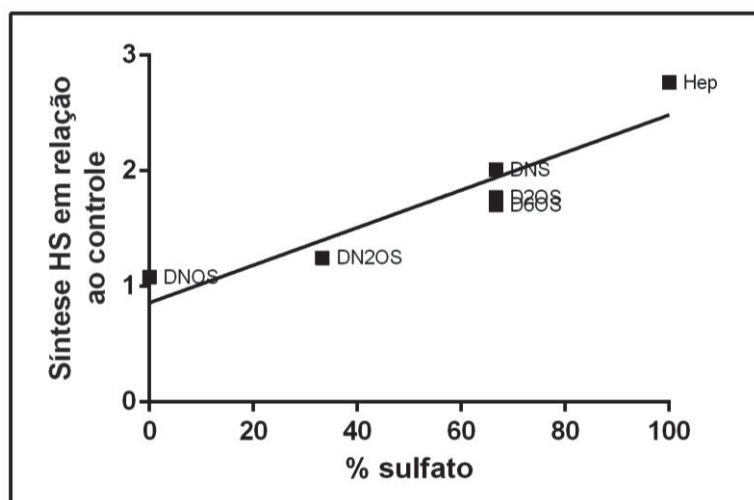
A heparina DN2OS aumentou apenas 24%, em relação ao controle, enquanto a heparina não modificada aumentou aproximadamente 170% a síntese de HS. Já a heparina DNOS praticamente não causou nenhuma alteração na síntese. Esses resultados mostram que a quantidade de sulfato na molécula de heparina parece ser essencial para o estímulo. Para comprovar essa hipótese, foi correlacionada a quantidade teórica de sulfato remanescente (Tabela 2), com a capacidade de estímulo de cada uma das heparinas dessulfatadas (Figura 7).

TABELA 2 – QUANTIDADE TEÓRICA DE SULFATO POR HEPARINA QUIMICAMENTE DESSULFATADA

	N-sulfato	6-O sulfato	2-O sulfato	Total	Sulfatos/ Dissacarídeo	%	Mediana Estímulo
Heparina	1	1	1	3	2,5	100	2,77
DNS	0	1	1	2	1,7	6,7	2,01
D6OS	1	0	1	2	1,7	6,7	1,70
D2OS	1	1	0	2	1,7	6,7	1,77
DN2OS	0	1	0	1	0,8	3,3	1,25
DNOS	0	0	0	1	0	0	1,08

A tabela acima ilustra a quantidade teórica de sulfato na heparina e em cada uma das heparinas dessulfatadas. Para cada grupamento sulfato, foi atribuído 1 (um) ponto. Como cada dissacarídeo de heparina tem em média 2,5 sulfatos (FU; SUFLITA; LINHARDT, 2016; JORPES; GARDELL, 1948), 3 pontos correspondem a 2,5 sulfatos por dissacarídeo. Para determinar a quantidade de sulfato das heparinas dessulfatadas, foi realizada uma regra de três simples. **Hep**: Heparina não modificada; **DNS**: Heparina *N*-dessulfatada; **D6OS**: heparina 6-O-dessulfatada; **D2OS**: heparina 2-O-dessulfatada; **DN2OS**: heparina *N*- e 2-O dessulfatada, **DNOS**: heparina totalmente dessulfatada. **FONTE**: o autor (2016).

FIGURA 7 – CORRELAÇÃO DA % DE SULFATO COM O ESTÍMULO DA SÍNTESE DE HS



O gráfico acima ilustra a correlação entre o estímulo da síntese de HS com a quantidade teórica de sulfato remanescente em cada uma das heparinas modificadas. **Hep**: Heparina não modificada; **DNS**: Heparina *N*-dessulfatada; **D6OS**: heparina 6-O-dessulfatada; **D2OS**: heparina 2-O-dessulfatada; **DN2OS**: heparina *N*- e 2-O dessulfatada, **DNOS**: heparina totalmente dessulfatada. Cada ponto representa a mediana dos quatro experimentos. Foi realizado um teste de correção de Pearson, com $p < 0.01$ e $R^2 = 0,8654$. **Fonte**: o autor (2016).

A correlação entre esses dois parâmetros, foi positiva, comprovando que quanto maior a quantidade de sulfato na heparina, maior será sua capacidade de estímulo da produção de HS em células endoteliais. Bastos (2011) utilizando heparinas com diferentes porcentagens de sulfato (obtidas por dessulfatações aleatórias), observou que, quanto menor o teor desse grupamento aniônico, menos estimulavam a síntese do HS em células endoteliais.

Outros polissacarídeos sulfatados, com estrutura diferente da heparina, também são capazes de estimularem a síntese de HS em células endoteliais. Como exemplo, pode-se citar os polissacarídeos extraídos de algas *Spatoglossum schröederi* (formados por fucoses sulfatadas e galactoses) (ROCHA et al., 2005), o PI88, um mistura de oligossacarídeos altamente sulfatados (BOUÇAS et al., 2012); o dextram sulfato (formado por glicoses sulfatadas) (NADER et al., 2004, 2001; PINHAL et al., 1994). Além disso, um composto fenólico altamente sulfatado (denominado de Composto Y), que não tem nenhuma relação com a molécula de heparina, tão quanto com a de um carboidrato, também foi capaz de estimular a síntese de HS. (PINHAL et al., 2001). Com base nesses dados e nos resultados obtidos no presente trabalho, sugerem que não existe uma posição especial em que o grupamento sulfato seja essencial para desencadear o estímulo, porém a quantidade líquida de grupamentos sulfatos que as moléculas contem resulta proporcionalmente à capacidade de estimular a síntese de HS. Essa dificuldade em estabelecer a importância de cada um dos grupamentos sulfatos, também aconteceu com Rudd e colaboradores (2010), ao realizarem experimentos de interação utilizando fatores de crescimento de fibroblasto 1 e 2 (FGF-1 e FGF-2), com heparinas quimicamente dessulfatadas ou com polissacarídeos sulfatados extraídos de plantas. Também não conseguiram encontrar um sulfato principal para a interação entre essas proteínas e a heparina, e além disso, grande parte dos polissacarídeos de plantas (que não possuem estrutura e conformação similar a heparina) foram capazes de manter uma ligação estável com essas proteínas, desde que apresentassem grupamentos sulfato. Esses dados mostram que várias sequências diferentes na heparina, ou até mesmo outros tipos de polissacarídeos, podem fornecer uma conformação e densidade de cargas necessárias para a interação com proteínas.

Vale destacar que cada grupamento sulfato na molécula de heparina, pode influenciar na conformação da molécula, principalmente o *N*-sulfato da glucosamina e o 2-*O*-sulfato do ácido L-idurônico, causam variações nas ligações glicosídicas e ácido urônico, podendo levar a alterações conformacionais na cadeia. Porém, a quantidade de dissacarídeos que podem ser formados na heparina é muito maior do que as possibilidades de conformação que esses açúcares podem assumir. Essa redundância implica que várias sequências de dissacarídeos podem assumir uma conformação ideal para interagir com alguma determinada proteína. (RUDD; YATES,

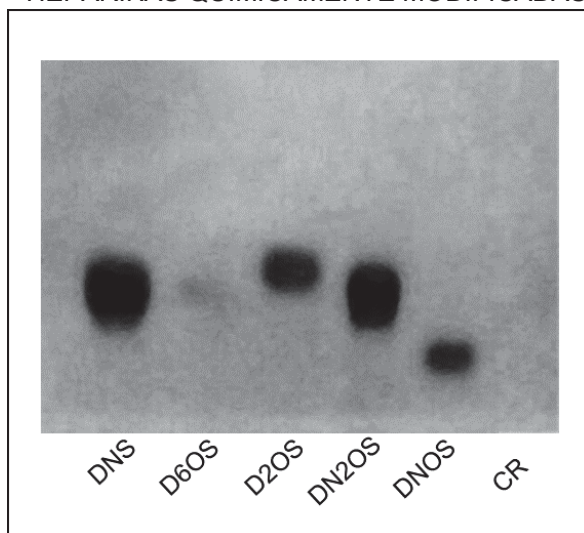
2010). Existem poucas evidências que a interação da heparina com proteínas é causada por uma sequência específica, essa redundância faz com que várias sequências diferentes possam interagir com a mesma proteína. (MENEGETTI et al., 2015).

Os resultados obtidos no presente trabalho, juntamente com os dados disponíveis na literatura, sugerem que o estímulo da síntese de HS é dependente da proporção de grupamentos sulfato.

5.2. AVALIAÇÃO DOS COMPONENTES DA MEC IMPORTANTES PARA O ESTÍMULO DA SÍNTESE DE HS

O próximo passo foi investigar se há uma correlação entre a síntese de HS e a capacidade de ligação desses compostos modificados à matriz extracelular. Para verificar essa ligação, as heparinas quimicamente modificadas foram submetidas ao processo de biotilação. O resultado dessa reação está ilustrado na Figura 8.

FIGURA 8 – HEPARINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS E BIOTINILADAS



As heparinas quimicamente modificadas foram biotinizadas conforme descrito em Material e Métodos. Para comprovar esse processo, 5 μ L de cada uma das amostras (1 mg/mL) foram aplicados em gel de agarose 0,5 % em tampão PDA (1-3 diaminopropano acetato) e submetidos a uma corrente elétrica constante de 80 mA. Após a corrida eletroforética, o gel foi transferido por capilaridade para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com estreptavidina conjugada com peroxidase e revelada com DAB (3,3,-diaminobenzidina). **Fonte:** O autor (2016)

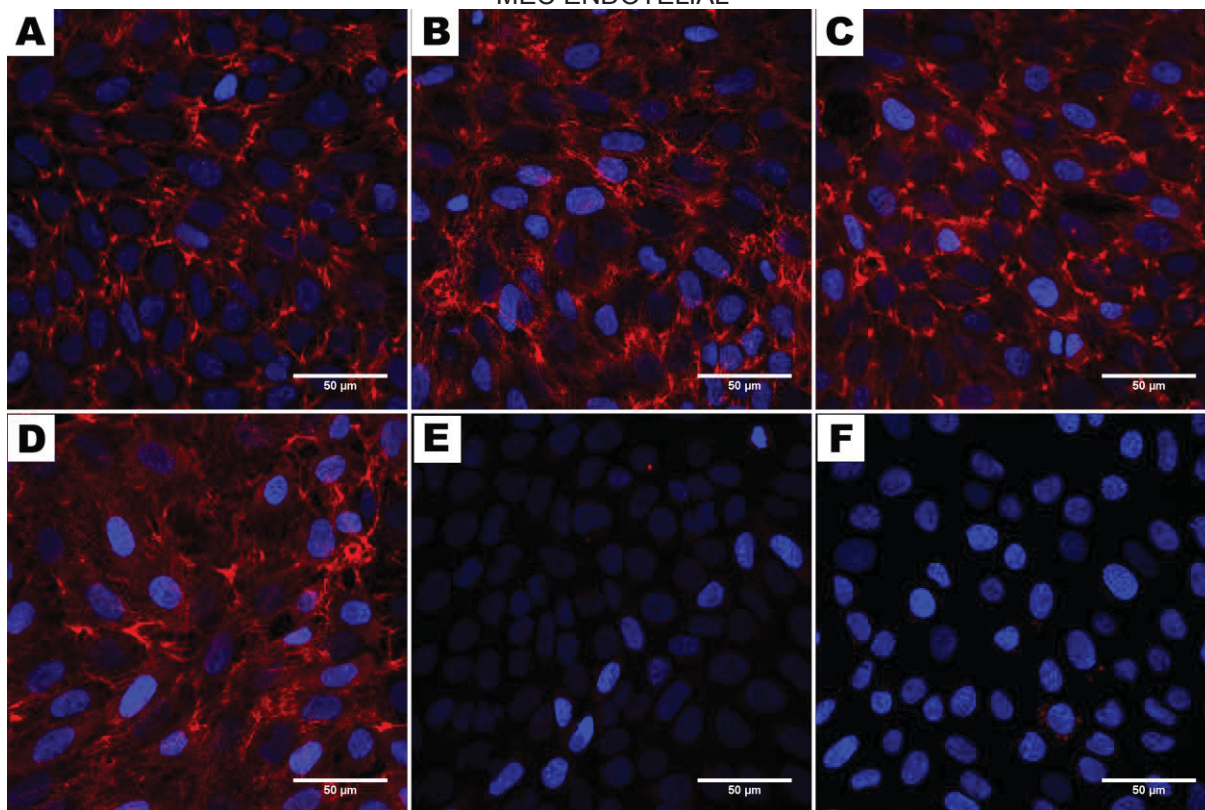
Como pode ser observado na Figura 8, todas as heparinas dessulfatadas foram biotinizadas com sucesso. Como a reação de ligação da biotina na heparina

utiliza os grupamentos carboxílicos (BOUÇAS et al., 2008), por isso, como era esperado, a reação não ocorreu na heparina CR.

Para avaliar a ligação dessas heparinas quimicamente dessulfatadas e biotiniladas na MEC endotelial, as células endoteliais foram cultivadas em lamínulas por 3 dias e então foram incubadas a 4°C com as heparinas quimicamente dessulfatadas (ou não) e biotiniladas (Figura 9).

Foi observada a ligação das heparinas DNS, D6OS e D2OS na MEC endotelial, cujo padrão de marcação foi similar ao da heparina não modificada e biotinilada, porém com menor intensidade. As heparinas DN2OS e DNOS não apresentaram nenhuma marcação.

FIGURA 9 – LIGAÇÃO DAS HEPARINAS QUIMICAMENTE DESSULTADAS E BIOTINILADAS NA MEC ENDOTELIAL



Células endoteliais foram cultivadas sobre lamínulas circulares por 3 dias e então expostas às heparinas quimicamente dessulfatadas e biotiniladas por 1 hora à 4°C. Após a incubação, as células foram fixadas com 2% de paraformaldeído, e as heparinas foram reveladas com estreptavidina conjugada com Alexa Fluor 594 (vermelho) e o núcleo foi marcado com DAPI (azul). As imagens foram obtidas no microscópio de varredura a laser confocal Nikon. **A** - heparina não modificada; **B** - heparina DNS; **C** - heparina D6OS; **D** - heparina D2OS; **E** - heparina DN2OS; **F** - heparina DNOS. **FONTE:** o autor (2016).

5.3 AVALIAÇÃO DOS CANDIDATOS NA MEC QUE LIGA A HEPARINA E DESENCADEIA O ESTÍMULO DA SÍNTESE DE PGHS

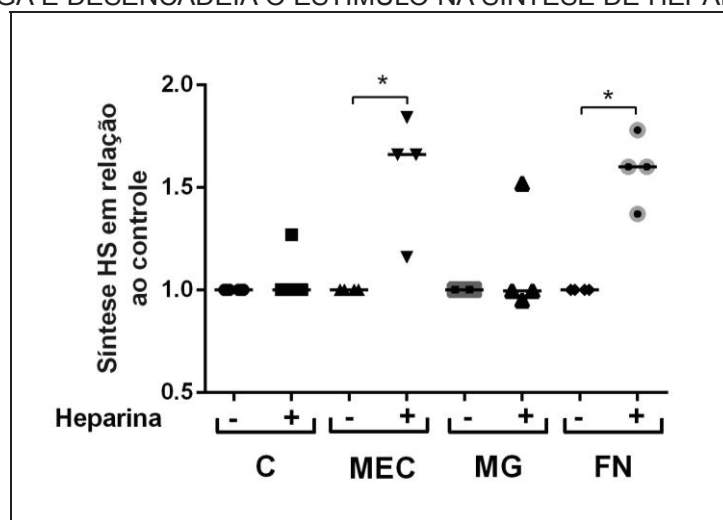
Trindade e colaboradores (2008a) demonstraram que para estimular a síntese de PGHS, a heparina precisa se ligar a matriz extracelular, porém, não foi determinada especificamente em qual(is) molécula(s). Para investigar esse sítio de ligação, as células foram cultivadas em poços previamente recobertos por MEC endógena (remanescente) ou exógena (matrigel), bem como em poços sem nenhuma cobertura especial prévia (controle). O estímulo da síntese de HS foi avaliado após o cultivo das células na presença de [³⁵S]-sulfato de sódio por 3 horas e na presença, ou não, de heparina não modificada. Os resultados estão ilustrados na Figura 10. Como esperado, as células que foram cultivadas sobre os poços que não continham nenhum tipo de cobertura, não apresentaram estímulo da síntese de HS. Já os poços que continham MEC endotelial (provenientes da própria célula) apresentaram um aumento significativo na síntese de HS, quando expostas à heparina, o que reforça a importância da MEC para o mecanismo de estímulo da síntese desse composto e está de acordo com os dados prévios obtidos pelo grupo. (TRINDADE et al., 2008a). Curiosamente, as células que foram cultivadas sobre o matrigel, não sofreram estímulo significativo na produção de HS, o que mostra que não é a MEC em si, mas algum(uns) de seus componentes que é(são) importante(s) para desencadear o fenômeno em questão.

Medeiros e colaboradores (2012), demonstraram que para que aconteça o estímulo, é necessária a interação de algum componente da MEC com as integrinas (proteínas transmembrânicas), via sequência RGD. O matrigel é composto principalmente por colágeno tipo IV, laminina e entactina. (HUGHES; POSTOVIT; LAJOIE, 2010; KLEINMAN; MARTIN, 2005). Das proteínas de MEC que compõem o matrigel, apenas o colágeno tipo IV pode realizar interações via o peptídeo RGD. (LOZITO; KOLF; TUAN, 2009).

Como a fibronectina também realiza esse tipo de interação via RGD (PANKOV, 2002), e também está presente na MEC das células endoteliais (ARNAOUTOVA et al., 2009), mas está ausente no matrigel, poder-se-ia supor que o estímulo necessita dessa molécula. Vale destacar que Trindade e colaboradores (2008a) ao confirmarem que a ligação da heparina era na matriz extracelular, utilizaram como marcador específico, justamente anticorpos anti-fibronectina e

observaram co-localização. Face ao exposto, a fibronectina também foi empregada como cobertura, para avaliar se o estímulo necessitaria de sua participação. As células que foram estimuladas com heparina, nos poços cobertos com fibronectina, apresentaram um aumento significativo na síntese de HS.

FIGURA 10 - AVALIAÇÃO DOS PROVÁVEIS COMPONENTES DA MEC QUE A HEPARINA SE LIGA E DESENCADEIA O ESTÍMULO NA SÍNTESE DE HEPARAM SULFATO



As células foram cultivadas em poços com coberturas previamente preparadas, sendo: sem nenhuma cobertura prévia (C); matriz extracelular endógena (proveniente de células endoteliais cultivadas por 3 dias) (MEC); cobertos com 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de matrigel (MG) e cobertos com 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de fibronectina (FN). As células permaneceram em cultura por 3 horas em meio de cultura contendo 150 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ de $[^{35}\text{S}]$ -sulfato de sódio, na presença ou ausência de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de heparina. Alíquotas do meio de cultura foram submetidas a proteólise e foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (0,55%) em tampão PDA, conforme descrito em Material e Métodos. Cada ponto no gráfico corresponde à mediana de um experimento realizado em triplicata e a linha representa a mediana entre eles. Análise estatística realizada foi o *Mann Witheney*, $*p < 0.05$. **FONTE:** O Autor (2016)

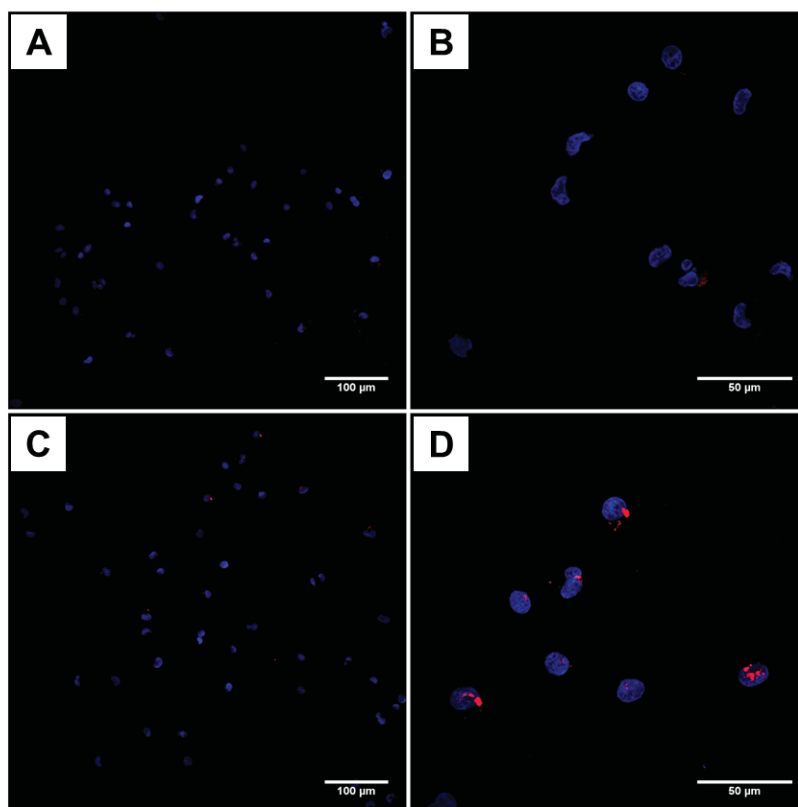
Os dados mostram que a fibronectina é essencial para o estímulo da síntese de HS, causado pela heparina. Para confirmar a importância dessa proteína o próximo passo foi realizar o silenciamento dessa proteína, utilizando técnica de siRNA.

5.4. O SILENCIAMENTO DE FIBRONECTINA LEVA À ABOLIÇÃO DO ESTÍMULO DA SÍNTESE DE PGHS

Antes de realizar os experimentos com o siRNA, foram necessários alguns testes para determinar as melhores condições de silenciamento da fibronectina. O primeiro passo foi verificar em quanto tempo essa proteína necessitava para ser secretada e depositada na matriz extracelular, bem como se a fibronectina presente no SFB poderia ficar aderida na placa. A Figura 11 mostra que as células cultivadas

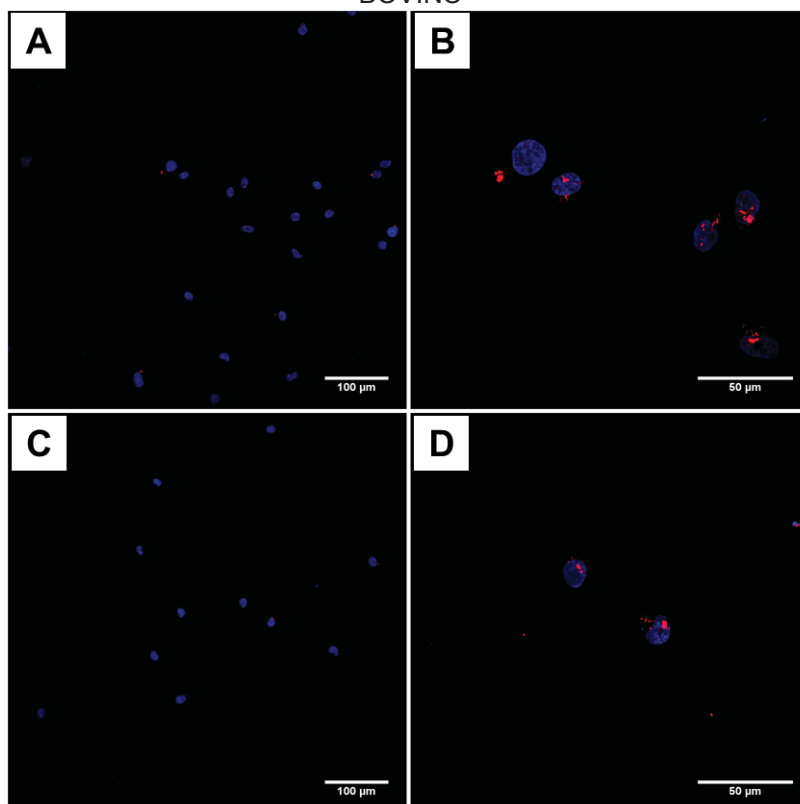
sem SFB não apresentam deposição de fibronectina na MEC, em nenhum dos tempos testados. Por outro lado, a fibronectina presente no SFB também não fica aderida na lamínula (Figura 12). Ainda, pode-se observar que 3 ou 6 horas, de cultura com 10% de SFB, não foram suficientes para as células endoteliais produzirem e depositarem fibronectina na MEC.

FIGURA 11 – DEPOSIÇÃO DE FIBRONECTINA EM CELULAS CULTIVADAS SEM SORO FETAL BOVINO



As células foram cultivadas em meio de cultura F12 sem SFB, sobre lamínulas circulares por 3 (A e B) ou 6 horas (C e D). As células foram incubadas com anticorpo anti-fibronectina (IgY de galinha) por 1 hora, a 4°C. A seguir, as células foram fixadas e então reveladas utilizando o anticorpo IgG anti-IgY (produzido em coelho), para reconhecimento do anticorpo primário, e sequencialmente, foi empregado o anticorpo anti-IgG de coelho, sendo esse conjugado com marcador fluorescente (*Texas Red* - vermelho). A seguir, o núcleo das células foi marcado com DAPI (azul). As imagens foram obtidas no microscópio de varredura a laser confocal, Nikon, utilizando as objetivas de 20x (A e C) (barra = 100 µm) e 60x (B e D) (barra = 50 µm). **FONTE:** O Autor (2016)

FIGURA 12 –DEPOSIÇÃO DE FIBRONECTINA EM CÉLULAS CULTIVADAS COM SORO FETAL BOVINO



As células foram cultivadas em meio de cultura F12 com SFB, sobre lamínulas circulares por 3 (A e B) ou 6 horas (C e D). As células foram incubadas com anticorpo anti-fibronectina (IgY de galinha) por 1 hora, a 4°C. A seguir, as células foram fixadas e então reveladas utilizando o anticorpo IgG anti-IgY (produzido em coelho), para reconhecimento do anticorpo primário, e sequencialmente, foi empregado o anticorpo anti-IgG de coelho, sendo esse conjugado com marcador fluorescente (*Texas Red* - vermelho). A seguir, o núcleo das células foi marcado com DAPI (azul). As imagens foram obtidas no microscópio de varredura a laser confocal, Nikon, utilizando as objetivas de 20x (A e C) (barra = 100 µm) e 60x (B e D) (barra = 50 µm). **FONTE:** O Autor (2016)

Com base nesses resultados, determinamos que para realizar os experimentos com o siRNA, as células endoteliais seriam plaqueadas e cultivadas por 6 horas com meio de cultura F12 contendo 10% de SFB, antes do siRNA ser adicionado.

O RNA de interferência para fibronectina desenhado para esse ensaio foi construído com base na sequência descrita por Cseh e colaboradores (2010), que utilizaram uma sequência baseada no RNA mensageiro humano, para silenciar a fibronectina em células endoteliais da aorta bovina. Essa sequência foi comparada com o RNA mensageiro de coelho (XM_008259120.1). Foi observado que algumas bases não eram homólogas, razão pela qual tiveram que ser alteradas para a construção de um RNA de interferência para a Fibronectina (siFN) das células de coelho utilizadas no presente trabalho, como ilustrado na Tabela 3.

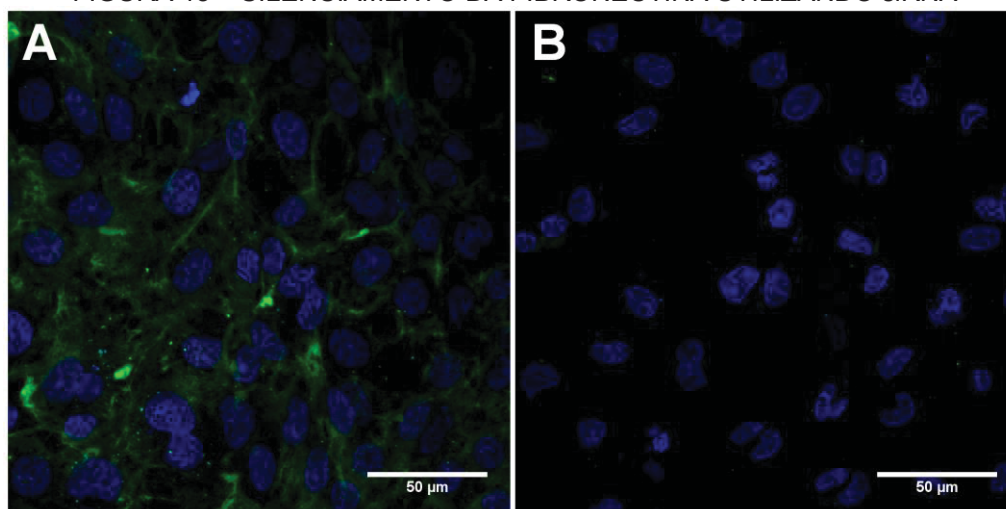
TABELA 3 – CONSTRUÇÃO DA SEQUÊNCIA PARA O siRNA

	Sequência
siFN – Cseh <i>et al.</i> (2010)	5'- ACA AUG GAG UGA ACU ACA A 3'- UGU UAC CUC ACU UGA UGU U
RNA mensageiro coelho (XM_008259120.1)	5'- ACA ACG GUG UGA ACU ACA A 3'- UGT UGC CAC ACU UGA UGU U
siFN – Rossi (2016)	5'- ACA ACG GUG UGA ACU ACA A 3'- UGU UGC CAC ACU UGA UGU U

A tabela acima, ilustra a comparação do alinhamento do siFN desenhado por Cseh e colaboradores (2010), com uma porção o mRNA do coelho. Essa comparação foi utilizada para construir a sequência do siRNA utilizada nesse experimento. Em vermelho estão representadas as bases que foram alteradas em relação a sequência utilizada por Cseh. **FONTE:** o autor (2016)

O segundo passo, foi avaliar se o siRNA desenhado era capaz de obter um silenciamento efetivo. Para tanto, as células foram tratadas com 100 nmol/mL e foi obtido um silenciamento satisfatório da fibronectina, como pode ser observar na Figura 13.

FIGURA 13 – SILENCIAMENTO DA FIBRONECTINA UTILIZANDO siRNA



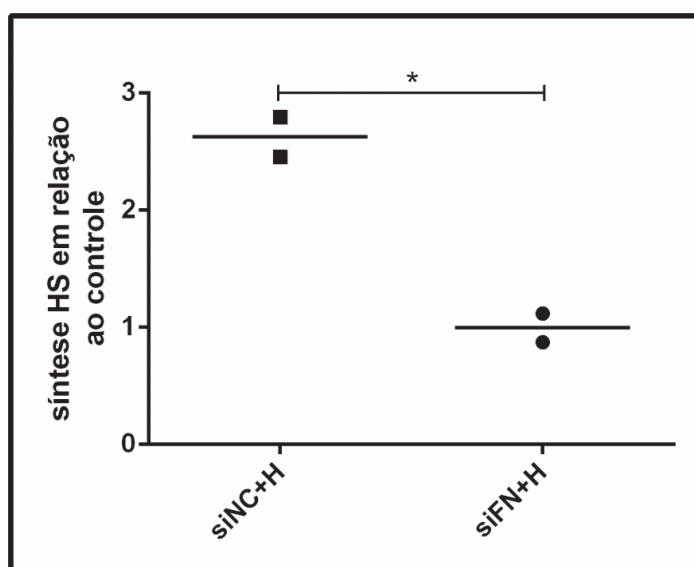
As células foram cultivadas sobre lamínulas circulares por 6 horas, e em seguida foram incubadas com 100 nmol/mL de siRNA com a sequência para silenciar a produção de fibronectina (A) ou com o siRNA com uma sequência não codificante (B). Após 72 horas de cultura na presença de siRNA, as células foram processadas para imunofluorescência, como descrito em Material e Métodos. As imagens foram obtidas no microscópio de varredura a laser confocal Nikon, utilizando a objetiva de 60x (barra = 50 µm). **FONTE:** O Autor (2016)

Após confirmar que a fibronectina está envolvida no estímulo da síntese de HS e determinar as melhores condições para realizar o silenciamento com dessa proteína com siRNA, foram realizados então os experimentos utilizando a marcação metabólica com o [³⁵S]-sulfato de sódio para avaliar o efeito da heparina sobre a

síntese de HS, em células silenciadas para fibronectina. A Figura 14 ilustra o resultado obtido. As células que foram cultivadas com o siRNA não codificante na presença de heparina, apresentaram o aumento da síntese do PGHS, quando comparado com o seu controle. No entanto, a heparina não é capaz de estimular a síntese de HS nas células que foram cultivadas com o siFN.

Esse conjunto de resultados comprova que a fibronectina é a molécula chave da MEC responsável por desencadear o estímulo, causado pela heparina.

FIGURA 14 – EFEITO DA HEPARINAS EM CÉLULAS SILENCIADAS PARA FIBRONECTINA
NOESTÍMULO DA SÍNTESE DE HS EM CÉLULAS ENDOTELIAIS



As células foram cultivadas em meio de cultura F-12 com 10% SFB, na presença de 100 nmol/mL de siFN (RNA de interferência para a Fibronectina) ou siNC (siRNA não codificante) por 3 dias. A seguir, as células foram expostas a 100 µg/mL de heparina, na presença de 150 µCi/mL de [³⁵S]-sulfato de sódio por 18 horas. Alíquotas do meio de cultura foram submetidas a proteólise e foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (0,55%) em tampão PDA, conforme descrito em Material e Métodos. **siNC+H**: células com siNC tratadas com heparina; **siFN+H**: células cultivadas com siFN e tratadas com heparina. Cada ponto no gráfico corresponde à mediana de um experimento realizado em triplicata e a linha representa a mediana entre eles. Análise estatística realizada foi o *Mann Witheney*, *p<0.05. **FONTE**: O Autor (2016)

Nossos dados mostram que a interação heparina-fibronectina é importante para causar o estímulo na síntese de HS.

O fato da heparina possuir uma característica aniônica faz com que ela interaja com uma grande variedade de moléculas. Proteínas podem conter em sua estrutura vários resíduos de aminoácidos básicos, que muitas vezes estão agrupados (tornando-as positivas), essas regiões são conhecidas como sítios de ligação para a heparina. (CAPILA; LINHARDT, 2002; MULLOY et al., 2016). Nesse

sentido, uma das primeiras sequências descobertas foi descrita por Cardin e Weintraub (1989), X-B-B-X-B-X e X-B-B-B-X-X-B-X, onde B é provavelmente um resíduo de aminoácido básico e X são aminoácidos hidropáticos. Vale destacar que a fibronectina é uma glicoproteína que apresenta diversos sítios de interações com outras moléculas, inclusive para a integrina $\alpha 5 \beta 1$, que reconhecem a sequência RGD da fibronectina (SINGH; CARRAHER; SCHWARZBAUER, 2012), bem como dois sítios de ligação para a heparina, sendo um mais fraco -próximo a região N-terminal (Hep-1)-, e outro mais forte na região C-terminal (Hep-2). (PANKOV, 2002). A região Hep-2 é composta por uma sequência de resíduos de aminoácidos carregados positivamente, formada por argininas e lisinas. (SHARMA et al., 1999). Essa região possui a sequência de ligação para a heparina, descrita por Cardin e Weintraub. (GALLAGHER, 2015). Além disso, já foi demonstrado que quando esses resíduos aminoácidos positivos foram mutados para a produção de resíduos polares sem carga, a ligação fica afetada (BUSBY et al., 1995).

Alguns autores descrevem que a fibronectina pode sofrer alterações conformacionais na presença de heparina, expondo assim sítios de ligação para outras moléculas ou para interagir com receptores. (HUBBARD et al., 2014; MITSU et al., 2006).

Os estudos de fibronectina-heparina possuem uma certa divergência sobre qual grupamento sulfato é importante para essa interação. Utilizando colunas de afinidade com fragmentos de Hep-2 imobilizados, Walker e Gallagher (1996) demonstraram que o sulfato *N*-ligado é importante para a interação. Já, Lyon e colaboradores (2000), utilizando a mesma técnica, observaram que todos os sulfatos contribuem para essa interação, porém existe uma hierarquia de importância: 2-O>6-O>N. Foi demonstrado também que o grupamento carboxílico contribui muito pouco para essa ligação. O único ponto em comum desses trabalhos é que a cadeia de heparina seja composta no mínimo um octassacarídeo. Carpentier e colaboradores (2014) analisaram *in silico* essa interação e observaram a mesma hierarquia sugerida por Lyon. Entretanto, os resultados obtidos no nosso trabalho mostraram que em sistema biológico essa hierarquia não se mantém, uma vez que não houve diferença no estímulo entre as heparinas que foram pontualmente dessulfatadas (DNS, D6OS, D2OS) e além disso as heparinas D6OS e D2OS apresentam o mesmo padrão de ligação.

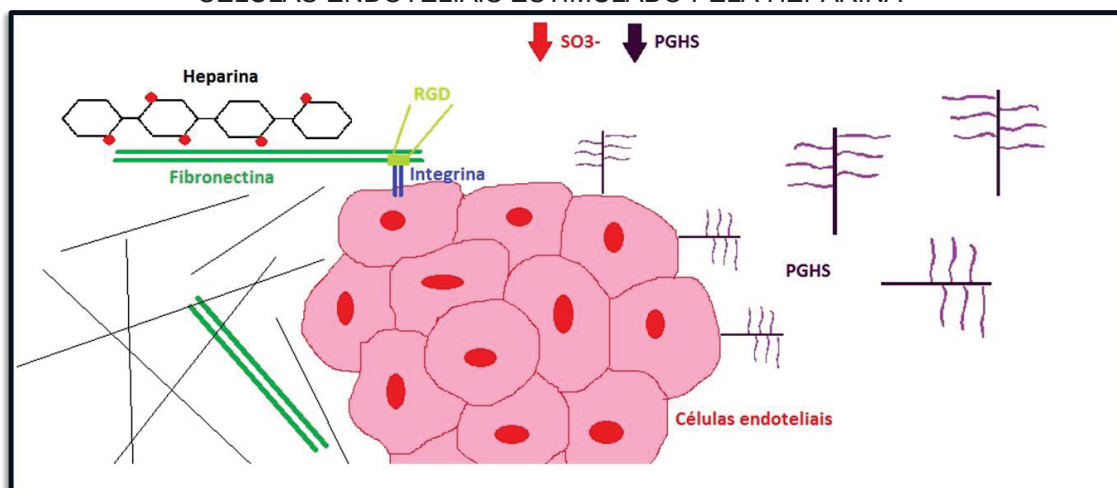
Com base nos resultados obtidos, podemos confirmar que o estímulo na síntese de PGHS estimulado pela heparina, não é decorrente apenas de um grupamento sulfato ligado em local específico (*N*- ou 6-*O* ligado na glucosamina ou 2-*O* ligado no ácido L-idurônico), mas sim decorrente da quantidade total desses grupamentos presente em cada uma das heparinas modificadas, já que a heparina totalmente dessulfatada deixou de estimular a s. Além disso, demonstramos que a fibronectina é uma proteína da MEC essencial para que ocorra esse fenômeno.

6 Conclusões

- O grupamento carboxílico na molécula de heparina não se mostrou importante para o estímulo da síntese de HS, uma vez que após a sua remoção completa não houve a abolição do estímulo nas células endoteliais *in vitro*;
- Os grupamentos sulfatos são importantes para o estímulo. Porém, não existe um sulfato especificamente ligado em uma posição determinada, que seja o responsável pelo estímulo na síntese de HS, mas sim a quantidade total desse grupamento aniônico;
- As heparinas DNS, D6OS e D2OS, mantem o mesmo padrão de ligação na MEC endotelial, porém com menor intensidade quando comparada com a heparina não modificada, o que é condizente com a redução do estímulo da síntese de PGHS.
- A fibronectina é a proteína na MEC que é responsável pelo estímulo da síntese de PGHS, causada pela ligação da heparina nas células endoteliais.

A Figura 15 apresenta uma ilustração com os principais resultados obtidos nesse trabalho.

FIGURA 15 – MECANISMO PROPOSTO PARA O ESTÍMULO DA SÍNTESE DE PGHS EM CÉLULAS ENDOTELIAIS ESTIMULADO PELA HEPARINA



Para que a heparina estimule a síntese do PGHS, ela tem que interagir com a fibronectina depositada na MEC, além disso, não existe um grupamento sulfato específico responsável por desencadear esse estímulo, mas sim a quantidade desse grupamento aniônico é importante. **FONTE:** O Autor (2016)

REFERÊNCIAS

ARNAOUTOVA, I. et al. The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. **Angiogenesis**, v. 12, n. 3, p. 267–274, 2009.

BASTOS, M. F. C. **Análise estrutural da heparina e sua relação com o mecanismo de estímulo da síntese de proteoglicano de heparan sulfato**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2011.

BOUÇAS, R. I. et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-like fluorescence assay to investigate the interactions of glycosaminoglycans to cells. **Analytica Chimica Acta**, v. 618, n. 2, p. 218–226, 23 jun. 2008.

BOUÇAS, R. I. et al. Glycosaminoglycan backbone is not required for the modulation of hemostasis: effect of different heparin derivatives and non-glycosaminoglycan analogs. **Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 31, n. 5, p. 308–16, jun. 2012.

BUONASSISI, V. Sulfated Mucopolysaccharide in endothelial synthesis and secretion in endothelial cell cultures. **Experimental cell research**, v. 76, p. 363–368, 1973.

BUSBY, T. F. et al. Heparin binding by fibronectin module III-13 involves six discontinuous basic residues brought together to form a cationic cradle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 18558–18562, 1995.

CAPILA, I.; LINHARDT, R. J. Heparin-protein interactions. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 41, n. 3, p. 391–412, 1 fev. 2002.

CARDIN, A. D.; WEINTRAUB, H. J. R. Molecular Modeling of Protein-Glycosaminoglycan Interactions. **Arteriosclerosis**, v. 9, p. 21–32, 1989.

CARPENTIER, M.; DENYS, A.; ALLAIN, F. Molecular docking of heparin oligosaccharides with Hep-II heparin-binding domain of fibronectin reveals an interplay between the different positions of sulfate groups. p. 161–169, 2014.

CASU, B.; NAGGI, A.; TORRI, G. Re-visiting the structure of heparin. **Carbohydrate Research**, v. 403, p. 60–68, 2014.

CHAUTARD, E. et al. MatrixDB, a database focused on extracellular protein-protein and protein-carbohydrate interactions. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 25, n. 5, p. 690–1, 1 mar. 2009.

COLBURN, P.; BUONASSISI, V. Anti-clotting activity of endothelial cell cultures and heparan sulfate proteoglycans. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 104, n. 1, p. 220–227, 1982.

COUCHMAN, J. R.; PATAKI, C. A. An introduction to proteoglycans and their

localization. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 60, n. 12, p. 885–97, dez. 2012.

CSEH, B. et al. Autocrine fibronectin directs matrix assembly and crosstalk between cell-matrix and cell-cell adhesion in vascular endothelial cells. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 22, p. 3989–3999, 15 nov. 2010.

DAY, J. R. .; LANDIS, R. .; TAYLOR, K. . Heparin is much more than just an anticoagulant. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, v. 18, n. 1, p. 93–100, fev. 2004.

DE AGOSTINI, A. I. et al. Localization of anticoagulant active heparan sulfate proteoglycans in vascular endothelium: antithrombin binding on cultured endothelial cells and perfused rat aorta. **The Journal of Cell Biology**, v. 111, n. 3, p. 1293–1304, 1 set. 1990.

DEANGELIS, P. L. Evolution of glycosaminoglycans and their glycosyltransferases: Implications for the extracellular matrices of animals and the capsules of pathogenic bacteria. **The Anatomical Record**, v. 268, n. 3, p. 317–326, 1 nov. 2002.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic Behaviour of Acidic Mucopolysaccharides in Diamine Buffers. **Analytical biochemistry**, v. 70, p. 645–647, 1976.

DIETRICH, C. P.; MICHELACCI, Y. M. C.; NADER, H. B. Mucopolysaccharidases from *Flavobacterium heparinum*: isolation, characterization, and use for structural analysis of chondroitin sulfates, heparin, and heparitin sulfates. In: MARSHAL, J. (Ed.). . **Mechanisms of Saccharide Polymerization and Depolymerization**. Cambridge: Elsevier, 1980. v. 1p. 317–329.

ESKO, J. D.; KIMATA, K.; LINDAHL, U. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In: VARKI, A. et al. (Eds.). . **Essentials of Glycobiology**. 2. ed. New York, NY: Cold Spring Harbor, 2009. p. 784.

ESKO, J. D.; SELLECK, S. B. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. **Annual review of biochemistry**, v. 71, p. 435–71, jan. 2002.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of cell science**, v. 123, n. Pt 24, p. 4195–200, 15 dez. 2010.

FU, L.; SUFLITA, M.; LINHARDT, R. J. Bioengineered heparins and heparan sulfates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 237–249, fev. 2016.

FUNDERBURGH, J. L. Keratan Sulfate Biosynthesis. **IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)**, v. 54, n. 4, p. 187–194, 1 out. 2002.

GALLAGHER, J. Fell-Muir Lecture : Heparan sulphate and the art of cell regulation : a polymer chain conducts the protein orchestra. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 96, p. 203–231, 2015.

GANDHI, N. S.; MANCERA, R. L. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. **Chemical biology & drug design**, v. 72, n. 6, p. 455–82, dez. 2008.

GULATI, K.; POLURI, K. M. Mechanistic and therapeutic overview of glycosaminoglycans: the unsung heroes of biomolecular signaling. **Glycoconjugate Journal**, v. 33, n. 1, p. 1–17, 3 fev. 2016.

HASCALL, V.; ESKO, J. D. Hyaluronan. In: VARKI, A. et al. (Eds.). . **Essentials of Glycobiology**. 2. ed. New York, NY: Cold Spring Harbor, 2009. p. 784.

HUBBARD, B. et al. Heparin-dependent regulation of fibronectin matrix conformation. **Matrix Biology**, v. 34, p. 124–131, fev. 2014.

HUGHES, C. S.; POSTOVIT, L. M.; LAJOIE, G. A. Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. **Proteomics**, v. 10, n. 9, p. 1886–1890, 16 fev. 2010.

IOZZO, R. V.; SCHAEFER, L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. **Matrix Biology**, v. 42, p. 11–55, 2015.

JAKQUES, L. . Heparins: anionic polyelectrolyte drugs. **Pharmacological reviews**, v. 31, n. 2, 1979.

JORPES, J. E.; GARDELL, S. On heparin monosulfuric acid. **Journal of biochemistry**, v. 176, p. 267–276, 1948.

KIM, S.-H.; TURNBULL, J.; GUIMOND, S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. **The Journal of endocrinology**, v. 209, n. 2, p. 139–51, maio 2011.

KIRKPATRICK, C. A; SELLECK, S. B. Heparan sulfate proteoglycans at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. 11, p. 1829–1832, 1 jun. 2007.

KLEINMAN, H. K.; MARTIN, G. R. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, n. 5, p. 378–386, out. 2005.

KNELSON, E. H.; NEE, J. C.; BLOBE, G. C. Heparan sulfate signaling in cancer. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 6, p. 277–288, 19 abr. 2014.

KOLSET, S. O.; PEJLER, G. Serglycin: A Structural and Functional Chameleon with Wide Impact on Immune Cells. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 10, p. 4927–4933, 15 nov. 2011.

KORPETINO, A. et al. Serglycin: At the Crossroad of Inflammation and Malignancy. **Frontiers in Oncology**, v. 3, n. January, p. 327, 2014.

KOSTOUREOU, V.; PAPALAZAROU, V. Non-collagenous ECM proteins in blood vessel morphogenesis and cancer. **Biochimica et biophysica acta**, 24 fev. 2014.

KOVALSZKY, I.; HJERPE, A.; DOBRA, K. Nuclear translocation of heparan sulfate proteoglycans and their functional significance. **Biochimica et biophysica acta**, 26 abr. 2014.

LEBLEU, V. S.; MACDONALD, B.; KALLURI, R. Structure and function of basement membranes. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 232, n. 9, p. 1121–9, out. 2007.

LI, L.; LY, M.; LINHARDT, R. J. Proteoglycan sequence. **Molecular BioSystems**, v. 8, n. 6, p. 1613, abr. 2012.

LOZITO, T. P.; KOLF, C. M.; TUAN, R. S. **Regulatory Networks in Stem Cells**. Totowa, NJ: Humana Press, 2009.

LYON, M. et al. Elucidation of the structural features of heparan sulfate important for interaction with the Hep-2 domain of fibronectin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 7, p. 4599–4606, 2000.

MCLEAN, J. The thromboplastic action of cephalin. **American Journal of Physiology**, v. 41, p. 250–257, 24 abr. 1916.

MEDEIROS, G. et al. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1475, n. 3, p. 287–294, 26 jul. 2000.

MEDEIROS, V. P. et al. Heparin-integrin interaction in endothelial cells: downstream signaling and heparan sulfate expression. **Journal of cellular physiology**, v. 227, n. 6, p. 2740–9, jun. 2012.

MENEGHETTI, M. C. Z. et al. Heparan sulfate and heparin interactions with proteins. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 12, n. 110, p. 20150589, 6 set. 2015.

MIKAMI, T.; KITAGAWA, H. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, n. 10, p. 4719–33, out. 2013.

MILLER, T. et al. Molecular engineering of glycosaminoglycan chemistry for biomolecule delivery. **Acta biomaterialia**, n. October, 8 out. 2013.

MITSI, M. et al. Heparin-mediated conformational changes in fibronectin expose vascular endothelial growth factor binding sites. **Biochemistry**, v. 45, n. 34, p. 10319–10328, 2006.

MULLOY, B. et al. Pharmacology of Heparin and Related Drugs. **Pharmacological Reviews**, v. 68, n. 1, p. 76–141, 15 dez. 2016.

MUÑOZ-GARCÍA, J. C. et al. Effect of the Substituents of the Neighboring Ring in the Conformational Equilibrium of Iduronate in Heparin-like Trisaccharides. **Chemistry - A European Journal**, v. 18, n. 51, p. 16319–16331, 14 dez. 2012.

NADER, H. et al. Heparins and Heparinoids: Occurrence, Structure and Mechanism

of Antithrombotic and Hemorrhagic Activities. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 9, p. 951–966, 1 abr. 2004.

NADER, H. B. et al. Heparin sequences in the heparan sulfate chains of an endothelial cell proteoglycan. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 11, p. 3565–9, jun. 1987.

NADER, H. B. et al. Heparin stimulates the synthesis and modifies the sulfation pattern of heparan sulfate proteoglycan from endothelial cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 140, n. 2, p. 305–310, ago. 1989.

NADER, H. B. et al. Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular endothelial cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 699–709, 2001.

NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Anticoagulant antithrombotic activities of heparin: Structural requirements, mechanism of action and clinical applications. **Ciência e Cultura (SBPC)**, v. 46, p. 297–302, 1994.

PANKOV, R. Fibronectin at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 20, p. 3861–3863, 15 out. 2002.

PINHAL, M. et al. Minimum fragments of the heparin molecule able to produce the accumulation and change of the sulfation pattern of an antithrombotic heparan sulfate from endothelial cells. **Thromb Haemost**, v. 74, n. 4, p. 1169–74, 1995.

PINHAL, M. A. . et al. Heparin and a Cyclic Octaphenol-Octasulfonic Acid (GL-522-Y-1) Bind With High Affinity to a 47-kDa Protein From Vascular Endothelial Cell Surface and Stimulate the Synthesis and Structural Changes of Heparan Sulfate Proteoglycan. **Thrombosis Research**, v. 103, n. 1, p. 35–45, jul. 2001.

PINHAL, M. A S. et al. Antithrombotic Agents Stimulate the Synthesis and Modify the sulfation pattern of a heparan sulfate proteoglycan from endothelial cells. **Thrombosis Research**, v. 74, n. 2, p. 143–153, 1994.

POMIN, V. H. Keratan sulfate: An up-to-date review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 282–289, 2015.

REICHLIN, S. **Heparin - A Century of Progress**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. v. 207

ROCHA, H. A O. et al. Structural and Hemostatic Activities of a Sulfated Galactofucan from the Brown Alga *Spatoglossum schroederi*: AN IDEAL ANTITHROMBOTIC AGENT? **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 50, p. 41278–41288, 16 dez. 2005.

ROSSI, G. R. **Avaliação dos requisitos estruturais da molécula de heparina que são necessários para o estímulo da síntese de proteoglicano de heparan sulfato em células endoteliais**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2013.

RUDD, T. R. et al. Comparable stabilisation, structural changes and activities can be induced in FGF by a variety of HS and non-GAG analogues: implications for sequence-activity relationships. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 8, n. 23, p. 5390–5397, 2010.

RUDD, T. R.; YATES, E. A. Conformational degeneracy restricts the effective information content of heparan sulfate. **Molecular bioSystems**, v. 6, n. 5, p. 902–8, maio 2010.

SARRAZIN, S.; LAMANNA, W. C.; ESKO, J. D. Heparan sulfate proteoglycans. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 7, jul. 2011.

SCHINDELIN, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676–682, 28 jun. 2012.

SCULLY, O. J. et al. Serglycin in Health and Diseases. **The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology**, v. 295, n. 9, p. 1415–1420, set. 2012.

SHARMA, A. et al. Crystal structure of a heparin- and integrin-binding segment of human fibronectin. **The EMBO journal**, v. 18, n. 6, p. 1468–1479, 1999.

SHRIVER, Z. et al. Heparin and Heparan sulfate: Analyzing structure and microheterogeneity. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 207, n. 207, p. 159–176, 2012.

SHWORAK, N. W. et al. Anticoagulant Heparan Sulfate: To Not Clot-Or Not. In: ZHANG, L. (Ed.). **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. [s.l.] Elsevier, 2010. v. 93p. 153–178.

SINGH, P.; CARRAHER, C.; SCHWARZBAUER, J. Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix. p. 397–419, 2012.

STEWART, M. D.; SANDERSON, R. D. Heparan sulfate in the nucleus and its control of cellular functions. **Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology**, p. 1–4, 3 dez. 2013.

THELIN, M. A. et al. Biological functions of iduronic acid in chondroitin/dermatan sulfate. **FEBS Journal**, v. 280, n. 10, p. 2431–2446, maio 2013.

THEOCHARIS, A. D. et al. Extracellular matrix structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 4–27, fev. 2016.

TRINDADE, E. DA S. **Heparina: Interação com a matriz de células endoteliais e atividade antitrombótica** Edvaldo da Silva Trindade São Paulo 2000. [s.l.] Universidade Federal de São Paulo, 2000.

TRINDADE, E. S. et al. Internalization and degradation of heparin is not required for stimulus of heparan sulfate proteoglycan synthesis. **Journal of cellular physiology**, v. 217, n. 2, p. 360–6, nov. 2008a.

TRINDADE, E. S. et al. The binding of heparin to the extracellular matrix of endothelial cells up-regulates the synthesis of an antithrombotic heparan sulfate proteoglycan. **Journal of Cellular Physiology**, v. 217, n. 2, p. 328–337, nov. 2008b.

VIOLA, M. et al. Biology and biotechnology of hyaluronan. **Glycoconjugate Journal**, v. 32, n. 3–4, p. 93–103, 2015.

VYNIOS, D. H.; KARAMANOS, N. K.; TSIGANOS, C. P. Advances in analysis of glycosaminoglycans: its application for the assessment of physiological and pathological states of connective tissues. **Journal of Chromatography**, v. 781, p. 21–38, 2002.

WALKER, A.; GALLAGHER, J. T. C-terminal heparin-binding domain of human plasma fibronectin (HEP II). **Biochem. J.**, v. 317, p. 871–877, 1996.

WARDROP, D.; KEELING, D. The story of the discovery of heparin and warfarin. **British journal of haematology**, v. 141, n. 6, p. 757–63, jun. 2008.

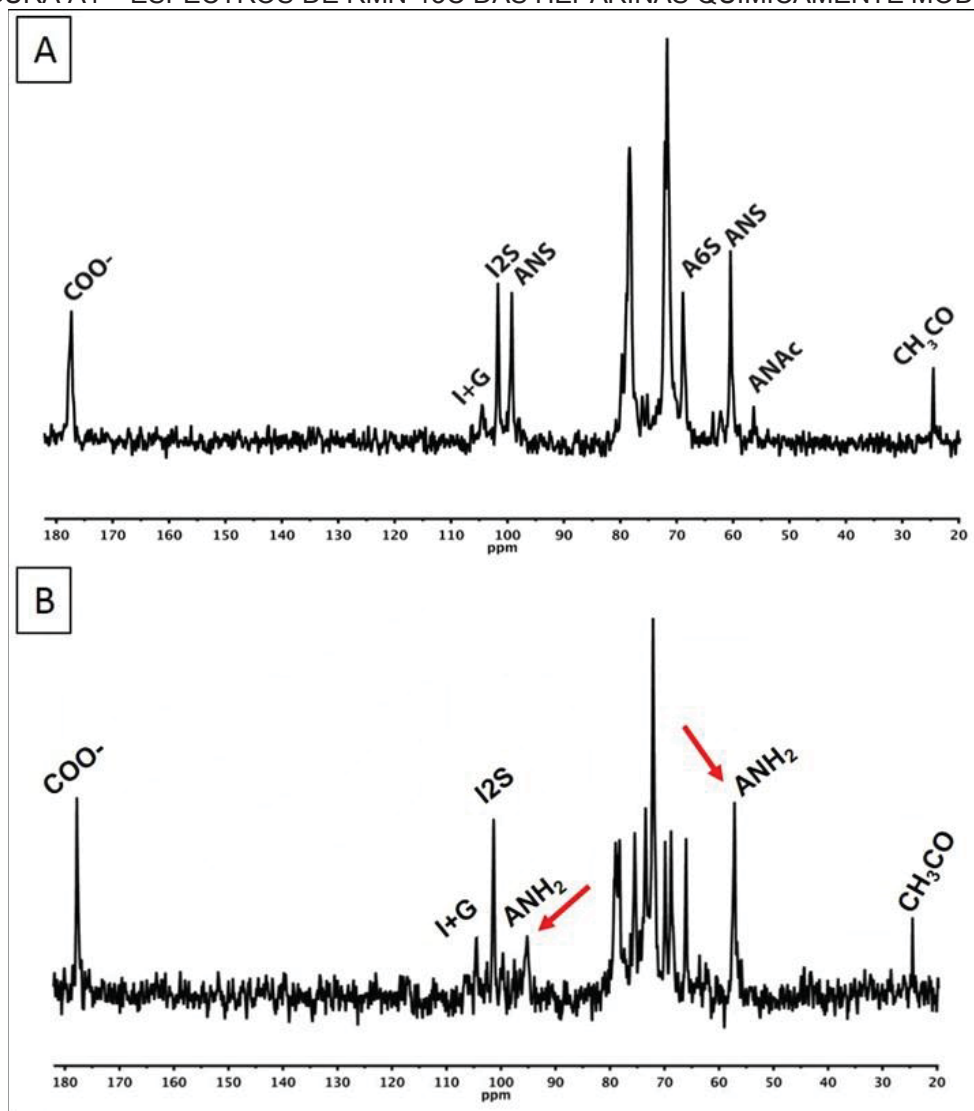
WEISSGERBER, T. L. et al. Beyond Bar and Line Graphs: Time for a New Data Presentation Paradigm. **PLOS Biology**, v. 13, n. 4, p. e1002128, 22 abr. 2015.

WHO. WHO Model List of Essential Medicines. v. 19, ago. 2015.

YATES, E. A. et al. ¹H and ¹³C NMR spectral assignments of the major sequences of twelve systematically modified heparin derivatives. **Carbohydrate research**, v. 294, p. 15–27, 20 nov. 1996.

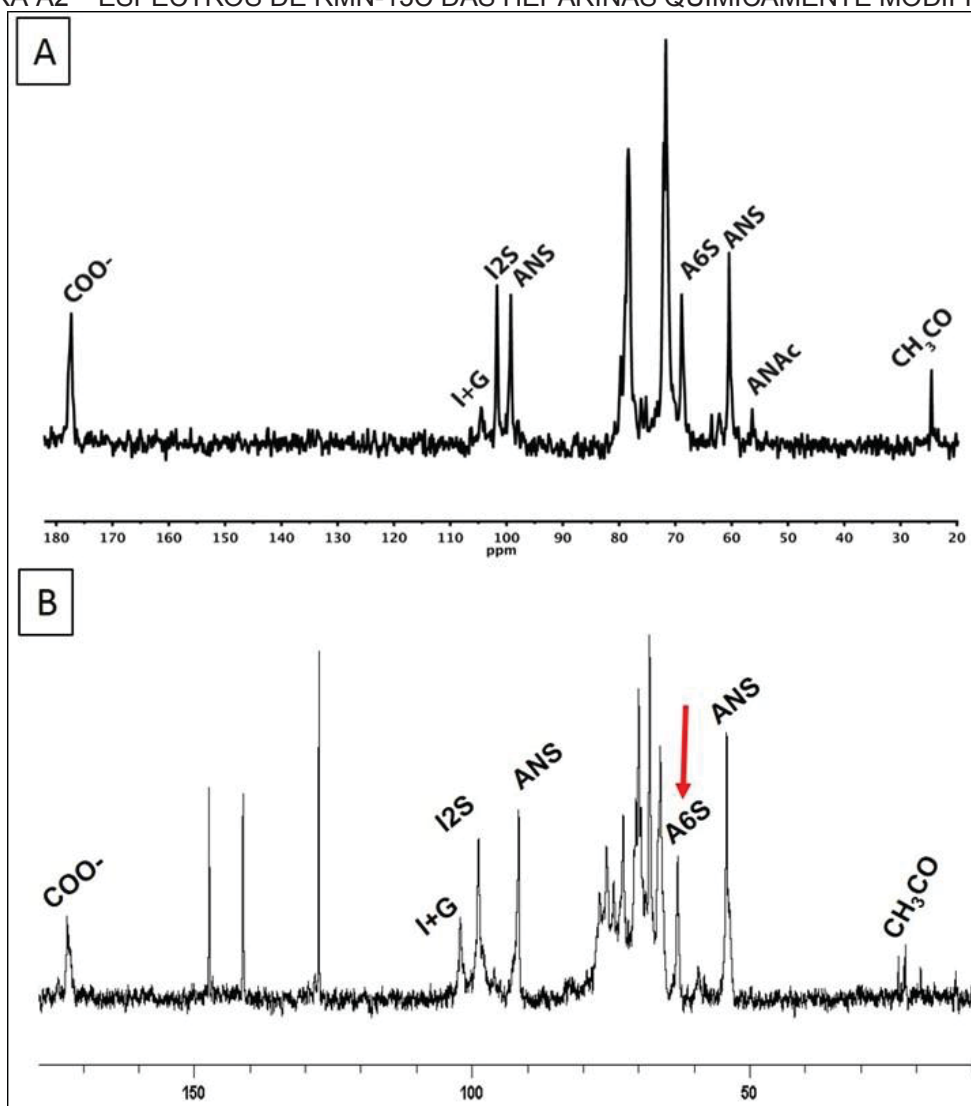
ANEXOS

FIGURA A1 – ESPECTROS DE RMN-13C DAS HEPARINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS



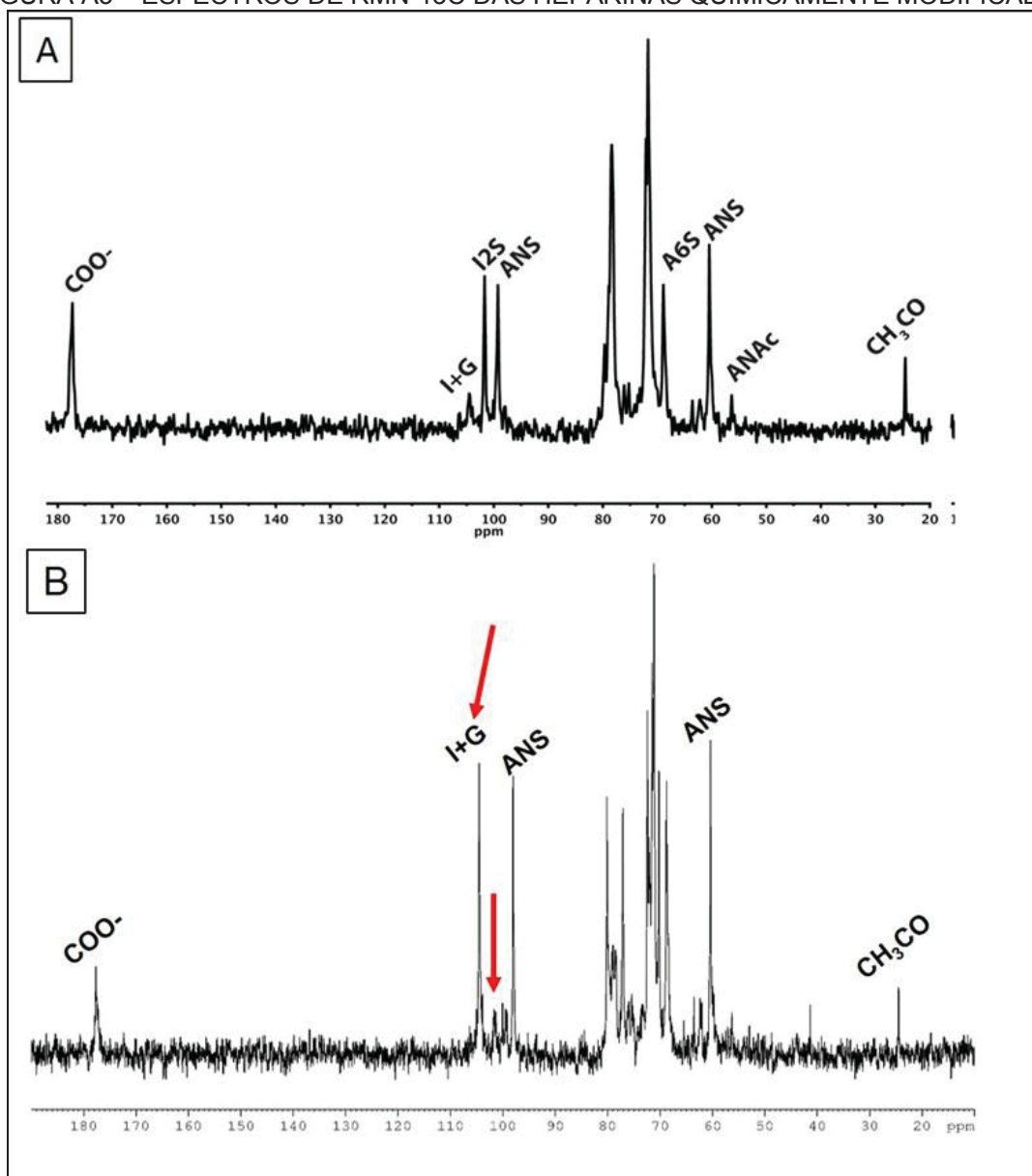
As amostras foram diluídas em água deuterada e analisadas em equipamento de ressonância magnética nuclear (RMN). COO⁻ - grupo carboxílico do ácido urônico; I+G – soma dos ácidos urônicos; ANS – sulfato ligado ao nitrogênio da glucosamina; ANH₂: amina livre da glucosamina; CH₃CO – grupo acetil ligado ao nitrogênio da glucosamina. A: heparina não modificada; B: heparina N-dessulfatada

FIGURA A2 – ESPECTROS DE RMN-13C DAS HEPARINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS



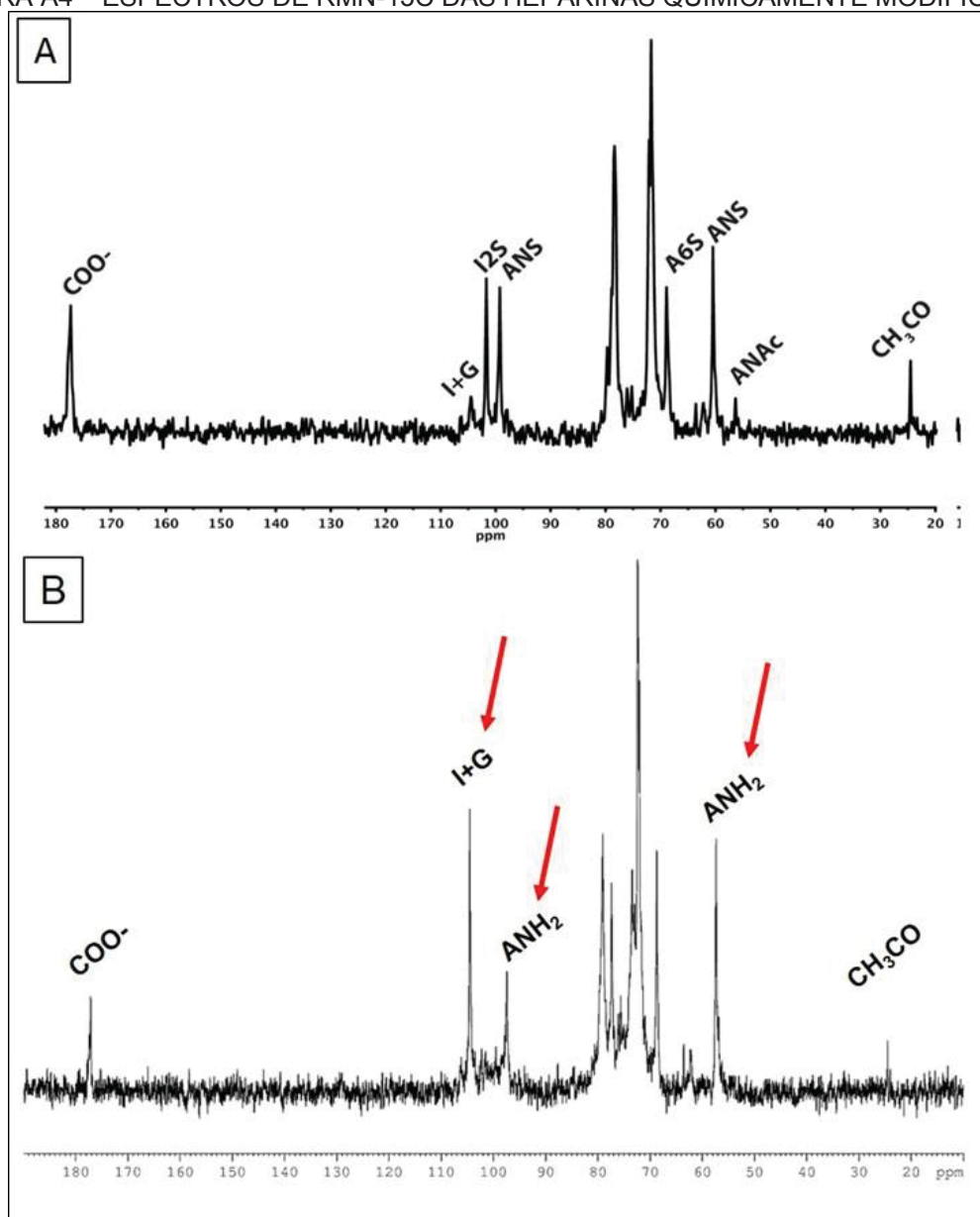
As amostras foram diluídas em água deuterada e analisadas em equipamento de ressonância magnética nuclear (RMN). COO⁻ - grupo carboxílico do ácido urônico; I+G – soma dos ácidos urônicos; ANS – sulfato ligado ao nitrogênio da glucosamina; A6S – sulfato ligado ao oxigênio do carbono 6 da glucosamina; CH₃CO – grupo acetil ligado ao nitrogênio da glucosamina. A: heparina não modificada; B: heparina 6-O-dessulfatada.

FIGURA A3 – ESPECTROS DE RMN-13C DAS HEPARINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS



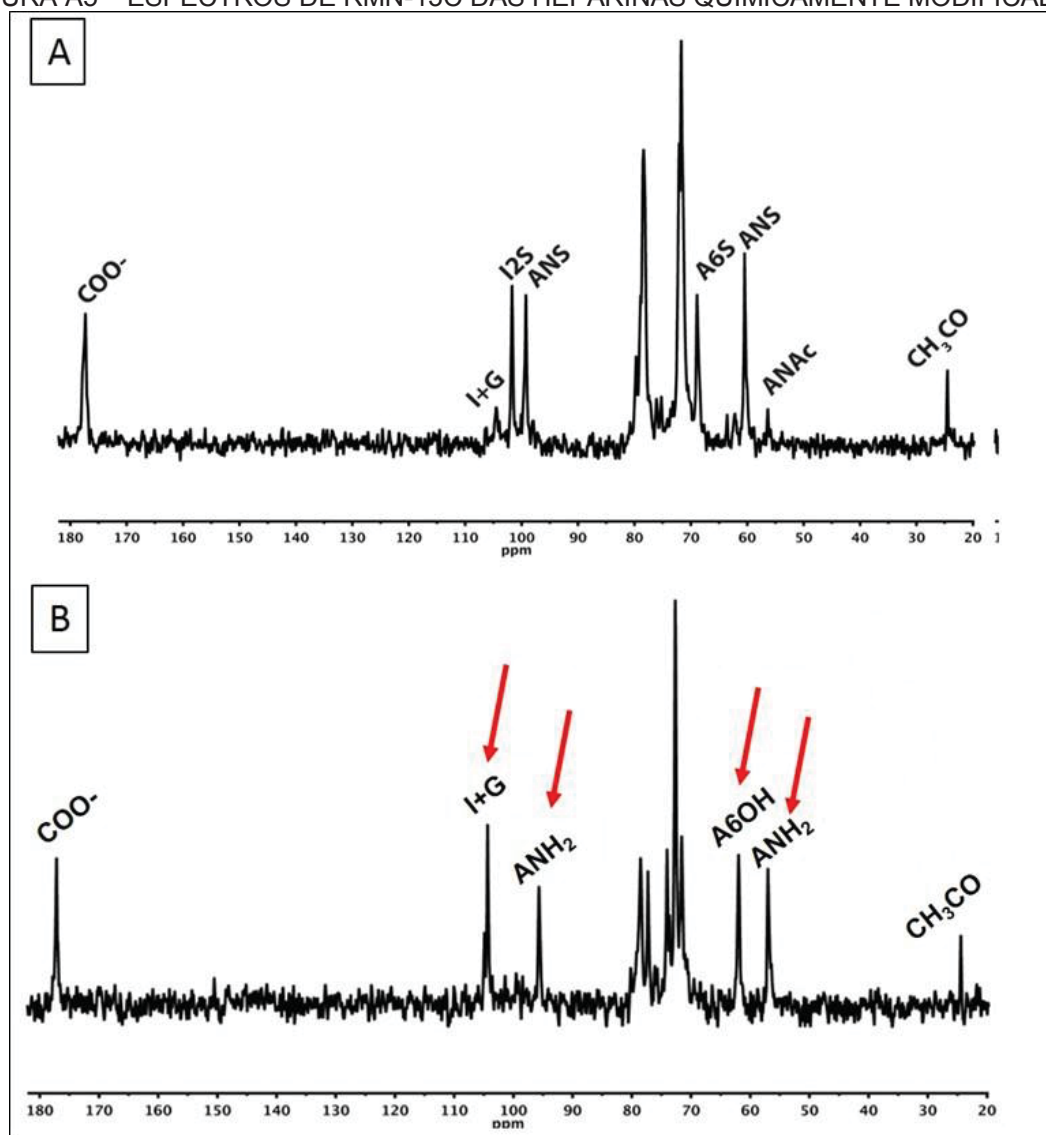
As amostras foram diluídas em água deuterada e analisadas em equipamento de ressonância magnética nuclear (RMN). COO⁻ - grupo carboxílico do ácido urônico; I+G – soma dos ácidos urônicos; ANS – sulfato ligado ao nitrogênio da glucosamina; CH₃CO – grupo acetil ligado ao nitrogênio da glucosamina. A: heparina não modificada; B: heparina 2-O-dessulfatada.

FIGURA A4 – ESPECTROS DE RMN-13C DAS HEPARINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS



As amostras foram diluídas em água deuterada e analisadas em equipamento de ressonância magnética nuclear (RMN). COO⁻ - grupo carboxílico do ácido urônico; I+G – soma dos ácidos urônicos; ANH₂ – amina livre ligada ao nitrogênio da glucosamina; ANH₂: amina livre da glucosamina e CH₃CO – grupo acetil ligado ao nitrogênio da glucosamina. A: heparina não modificada; B: heparina N- e 2-O-dessulfada.

FIGURA A5 – ESPECTROS DE RMN-13C DAS HEPARINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS



As amostras foram diluídas em água deuterada e analisadas em equipamento de ressonância magnética nuclear (RMN). COO⁻ - grupo carboxílico do ácido urônico; I+G – soma de ácido urônico e hexosamina; ANH₂ – amina livre ligada ao nitrogênio da glucosamina; A6OH – sulfato removido do oxigênio ligado ao carbono 6 da glucosamina; ANH₂: amina livre da glucosamina e CH₃CO – grupo acetil ligado ao nitrogênio da glucosamina. A: heparina não modificada; B: heparina totalmente dessulfatada.

FIGURA A6 – AUTORIZAÇÃO DE USO DA FIGURA 1

10/03/2016

RightsLink Printable License

**JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Mar 10, 2016

This Agreement between Gustavo Rossi ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	3825620867670
License date	Mar 10, 2016
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Chemistry - A European Journal
Licensed Content Title	Effect of the Substituents of the Neighboring Ring in the Conformational Equilibrium of Iduronate in Heparin-like Trisaccharides
Licensed Content Author	Juan Carlos Muñoz-García, Javier López-Prados, Jesús Angulo, Irene Díaz-Contreras, Niels Reichardt, José L. de Paz, Manuel Martín-Lomas, Pedro M. Nieto
Licensed Content Date	Nov 9, 2012
Pages	13
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic

FIGURA A7 – AUTORIZAÇÃO DE USO DA FIGURA 3

10/03/2016

RightsLink Printable License

**JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Mar 10, 2016

This Agreement between Gustavo Rossi ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	3825611234700
License date	Mar 10, 2016
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Journal of Cellular Physiology
Licensed Content Title	The binding of heparin to the extracellular matrix of endothelial cells up-regulates the synthesis of an antithrombotic heparan sulfate proteoglycan
Licensed Content Author	Edvaldo S. Trindade, Constance Oliver, Maria C. Jamur, Hugo A.O. Rocha, Célia R.C. Franco, Rodrigo I. Bouças, Thais R. Jarrouge, Maria A.S. Pinhal, Ivarne L.S. Tersariol, Tiago C. Gouvêa, Carl P. Dietrich, Helena B. Nader
Licensed Content Date	Jun 9, 2008
Pages	10
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic

FIGURA A8 – AUTORIZAÇÃO DE USO DA FIGURA 4

11/03/2016

RightsLink Printable License

**JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Mar 11, 2016

This Agreement between Gustavo Rossi ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	3825940353429
License date	Mar 11, 2016
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Journal of Cellular Physiology
Licensed Content Title	Heparin-integrin interaction in endothelial cells: Downstream signaling and heparan sulfate expression
Licensed Content Author	Valquíria P. Medeiros, Edgar J. Paredes-Gamero, Hugo P. Monteiro, Hugo A.O. Rocha, Edvaldo S. Trindade, Helena B. Nader
Licensed Content Date	Jan 18, 2013
Pages	10
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table